

## Resumen

### **“Procesado de nuevos poliésteres y poliesteramidas mediante electrospinning. Matrices de micro/nanofibras para el crecimiento celular”.**

En este PFC se ha realizado el estudio de la aplicación del electrospinning o electrohilado para el procesamiento de nuevos polímeros biodegradables pertenecientes a los grupos de los poliésteres (PE) y poliesteramidas (PEA). Para ello, se han sintetizado por policondensación térmica dos nuevos PE alifáticos con un número impar de grupos metileno, a partir del 1,9-nonanediol con distintas proporciones de los ácidos azelaico y piméico, el PE(9,9) y el PE(9,7). Además, se ha sintetizado por policondensación en solución de tipo interfacial la PEA derivada del ácido glicólico (GLC) y del ácido cloroacetil-6-aminoheptanoico (AMH), y se denomina poli(glicol aminoheptanoico) (poli(GLC-AMH)). Los nuevos polímeros fueron caracterizados por diversos métodos físicos-químicos como FTIR, RMN, GPC y DSC.

Así, la poliesteramida poli(GLC-AMH) y los poliésteres PE(9,9), PE(9,7), y sus copolímeros PE(9,9/9,7)-x% fueron procesados por electrospinning para conseguir matrices de micro/nanofibras. Para realizar este procesamiento se requirió optimizar los parámetros de las disoluciones de los nuevos polímeros como la concentración y disolventes. Asimismo, se optimizaron los parámetros operacionales del electrospinning como la distancia aguja-colector, flujo de inyección de la disolución polimérica, y voltaje del campo electrostático. Durante la optimización del proceso de electrohilado se realizó un continuo seguimiento mediante microscopía óptica; la observación directa de las muestras permitió establecer los cambios necesarios en los parámetros operacionales del electrospinning hasta conseguir su optimización.

Las matrices de nanofibras obtenidas en condiciones óptimas fueron estudiadas por microscopía electrónica de barrido para su caracterización morfológica y análisis de la distribución de diámetros de las fibras.

Finalmente, las matrices de nanofibras obtenidas de estos nuevos polímeros fueron evaluadas como scaffolds o plataformas de soporte para la adhesión y proliferación de células epiteliales mediante la técnica de cultivo *in-vitro* de líneas celulares.

# Sumario

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>SUMARIO</b>	<b>2</b>
<b>1. GLOSARIO</b>	<b>5</b>
<b>2. PREFACIO</b>	<b>7</b>
2.2. Origen del proyecto.....	7
2.3. Motivación .....	7
2.4. Requerimientos previos .....	8
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
3.1. Polímero y Polimerización .....	9
3.1.1. Definición .....	9
3.1.2. Polimerización .....	10
3.2. Estructura de los Polímeros.....	15
3.2.1. Estructura Química.....	15
3.2.1. Estructura física.....	20
3.3. Polímeros biodegradables .....	22
3.3.1. Degradación .....	23
3.4. Poliésteres.....	23
3.5. Poliésteramidas.....	26
3.6. Aplicaciones biomédicas de los polímeros biodegradables.....	28
3.6.1. Suturas quirúrgicas .....	29
3.6.2. Barreras temporales.....	29
3.6.3. Dispositivos de liberación de fármacos .....	30
3.6.4. “Temporary scaffolds” (andamios temporales).....	30
3.7. Polímeros biodegradables e ingeniería de tejidos .....	31
3.7.1. Diseño de futuros materiales .....	34
3.7.2. Requisitos para un scaffold: presente y futuro .....	36
3.7.3. Procesamiento de scaffolds.....	38
3.7.4. Origen de las células.....	42
3.8. Electrospinning.....	44
3.8.1. Principios de la técnica.....	44
3.8.2. Parámetros de proceso.....	46
3.8.3. Aplicaciones generales .....	47
3.8.4. Aplicaciones biomédicas.....	50

<b>4. OBJETIVOS DEL PROYECTO</b>	<b>53</b>
4.1. Objetivo General .....	53
4.2. Objetivos específicos .....	53
4.3. Alcance del proyecto .....	54
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>55</b>
5.1. Reactivos y solventes .....	55
5.2. Equipos y fundamentos de las técnicas experimentales.....	55
5.2.1. Espectrofotómetro de Infrarrojo (IR) .....	56
5.2.2. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	59
5.2.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	60
5.2.4. Electrospinning (Electrohilado).....	63
5.2.5. Microscopio Óptico .....	64
5.2.6. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) .....	65
5.2.7. Microscopio electrónico de barrido (SEM) .....	65
5.3. Adhesión y proliferación celular: Biocompatibilidad <i>in-vitro</i> .....	66
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>71</b>
6.1. Síntesis de la Poliesteramida poli(GLC-AMH).....	71
6.2. Síntesis de Poliésteres (PE) .....	78
6.3. Electrospinning de poli(GLC-AMH).....	85
6.4. Electrospinning de los poliésteres (PE) .....	87
6.4.1. Electrospinning del PE (9,9).....	87
6.4.2. Electrospinning del PE (9,7).....	93
6.5. Caracterización morfológica de las fibras de PE (9,9) y los copolímeros PE (9,9/9,7) .....	96
6.6. Electrospinning de Policaprolactona (PCL) .....	100
6.7. Biocompatibilidad de las matrices de nanofibras.....	102
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>107</b>
<b>8. ESTUDIO DE SOSTENIBILIDAD DEL PFC</b>	<b>108</b>
8.1. Impacto medioambiental y salud e impacto social. ....	109
8.2. Equipos y material diverso .....	111
8.3. Servicios generales .....	111
<b>9. EVALUACIÓN ECONÓMICA DEL PFC</b>	<b>112</b>
9.1. Coste de los materiales (productos químicos) .....	112
9.2. Coste del material (equipos) .....	113
9.3. Coste de personal .....	114

9.4. Costo Total del Proyecto.....	114
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>116</b>



# 1. Glosario

**PFC:** Proyecto Final de Carrera

**PGH:** Poli(glicol aminohexanoico)

**GLC:** Ácido glicólico

**PEA:** Polieseteramida

**PE:** Poliéster

**PA:** Poliamida

**PU:** Poliuretano

**PE(x,y):** Nomenclatura para homopoliésteres en la que x es el número de carbonos del diol, e y el número de carbonos del diácido. Por ejemplo, PE (9,7) es un poliéster de un diol de nueve carbonos y un diácido de siete.

**PE(x,y/x,y')-z:** Acrónimo que designa los copoliésteres de este PFC, donde x es el número de carbonos de la unidad diol, y e y' son los carbonos de las unidades de los dos diácidos (azelaico y pimélico, respectivamente, y z el porcentaje en ácido azelaico. Como ejemplo, PE(9,9/9,7)-80% indica el copoliéster sintetizado a partir 1,9-nonanodiol, un 20% de ácido pimélico y un 80% ácido azelaico.

**PLA:** Poliláctico

**PCL:** Policaprolactona

**HFIP:** Hexafluoro isopropanol

**DSC:** Calorimetría diferencial de barrido

**FTIR:** Espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier

**RMN:** Resonancia Magnética nuclear

**SEM:** Microscopia electrónica de barrido

**TEM:** Microscopia electrónica de transmisión

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear

**IR:** Espectroscopia de Infrarrojo

**FT-IR:** Espectroscopia de Infrarrojo de Transformada de Fourier

**UV:** Espectroscopia de Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

**DSC:** Calorimetría diferencial de barrido

**TEM:** Microscopia electrónica de transmisión

**SEM:** Microscopia electrónica de barrido

**UCR:** Unidad constitucional repetitiva

**PM:** Peso molecular

**M<sub>n</sub>:** Peso molecular promedio en numero

**M<sub>w</sub>:** Peso molecular promedio en peso

**PD:** Índice de polidispersidad

**T<sub>f</sub>:** Temperatura de fusión

**T<sub>g</sub>:** Temperatura de transición vítrea.

**T<sub>m</sub>:** Temperatura de cristalización

**ΔH<sub>f</sub>:** Entalpía de fusión

**ΔH<sub>c</sub>:** Entalpía de cristalización

**Electrospinning:** Electrohilado

**Scaffold:** Andamio tridimensional

**PAN:** Poliacrilonitrilo

**PET:** Poli(etilen terftalato)

## 2. Prefacio

### 2.2. Origen del proyecto

En la actualidad las constantes necesidades de los países condicionan que la industria de los polímeros continúe con su gran avance, motivado no sólo por el crecimiento de la industria del envase y el embalaje, sino que también sus amplias posibilidades de aplicación en el campo de la medicina favorece el desarrollo de nuevo productos y sus aplicaciones, mejorando las propiedades de los ya existentes y desarrollando nuevos polímeros para aplicaciones cada vez más específicas.

Los polímeros utilizados en este proyecto son poliésteres y poliesteramidas, que constituyen *per-se* una de las familias más importantes en lo que a polímeros biodegradables se refiere, debido a su capacidad de degradación por hidrólisis de los enlaces éster que los constituyen, como ejemplos de poliésteres biodegradables más comerciales, el Bionolle® (derivado del 1,4-butanodiol y del ácido succínico), el poliláctico (PLA) o la policaprolactona (PCL), lo que pone de manifiesto su creciente importancia en el mercado actual.

Por su biocompatibilidad, se han seleccionado para el estudio de nuevos materiales con posibles aplicaciones en biomedicina. Además de un conjunto de poliésteres, hemos estudiado una poliesteramida. Estos materiales están formados (como indica su nombre) por cadenas que contienen enlaces éster y amida. En las poliesteramidas, se combinan buenas propiedades mecánicas y la capacidad de biodegradabilidad; ambas características son demandadas frecuentemente en el mercado. Así, la síntesis de nuevas poliesteramidas contribuirá a la diversidad de polímeros biodegradables y a sus posibles aplicaciones en el campo biomédico.

### 2.3. Motivación

La motivación principal de la realización de este proyecto surge de mi voluntad personal de ampliar mis conocimientos relativos a los materiales poliméricos adquiridos a lo largo de la carrera. Es por este motivo, que durante un tiempo he colaborado con el Departamento de Ingeniería Química dentro de un proyecto de investigación para el desarrollo de nuevos materiales con aplicaciones biomédicas.

Concretamente, este proyecto se centra en el estudio de polímeros que pertenecen a las familias de los poliésteres y poliesteramidas (PE y PEA, respectivamente). Se debe remarcar que, el grupo de investigación en el que se ha realizado este Proyecto cuenta con

una gran experiencia en el estudio de polímeros biodegradables. Este hecho permite señalar como uno de los objetivos de este PFC la exploración de una nueva familia de poliesteramidas aptas para aplicaciones en las que entre en contacto con tejidos de seres vivos.

Finalmente, añadir que la realización de este proyecto me ha permitido adquirir una amplia experiencia en el manejo de equipos de laboratorio, iniciarme en trabajos de investigación, así como también desarrollar mi capacidad de trabajo en equipo.

## **2.4. Requerimientos previos**

Este Proyecto Final de Carrera (PFC) es un trabajo que se ha desarrollado mayoritariamente en un laboratorio de investigación, en el cual se han utilizado un gran número de técnicas, que han requerido un aprendizaje previo; una gran variedad de reactivos, que han requerido una búsqueda de fichas técnicas de seguridad para su uso correcto y seguro; etc.

Previamente a su realización, se ha realizado una revisión bibliográfica sobre aspectos químicos y estructurales de los polímeros PLA y PEG en los campos de la medicina y farmacia.

Respecto al desarrollo de la parte experimental del trabajo, primero se ha realizado la síntesis y caracterización de los PE y PEA. Para ello, son necesarios conocimientos sobre técnicas experimentales como espectroscopia de IR, RMN y UV o estudios de propiedades térmicas (punto de fusión, temperatura de descomposición).

Seguidamente, se estableció un plan de trabajo para preparar diferentes matrices poliméricas de los diversos poliésteres y sus mezclas y la poliesteramida.

Para la caracterización de las matrices se utilizan distintas técnicas como espectroscopia y microscopía.

Finalmente, se han realizado ensayos de adhesión y proliferación celular para estudiar la biocompatibilidad de los nuevos materiales.

## 3. Introducción

### 3.1. Polímero y Polimerización

#### 3.1.1. Definición

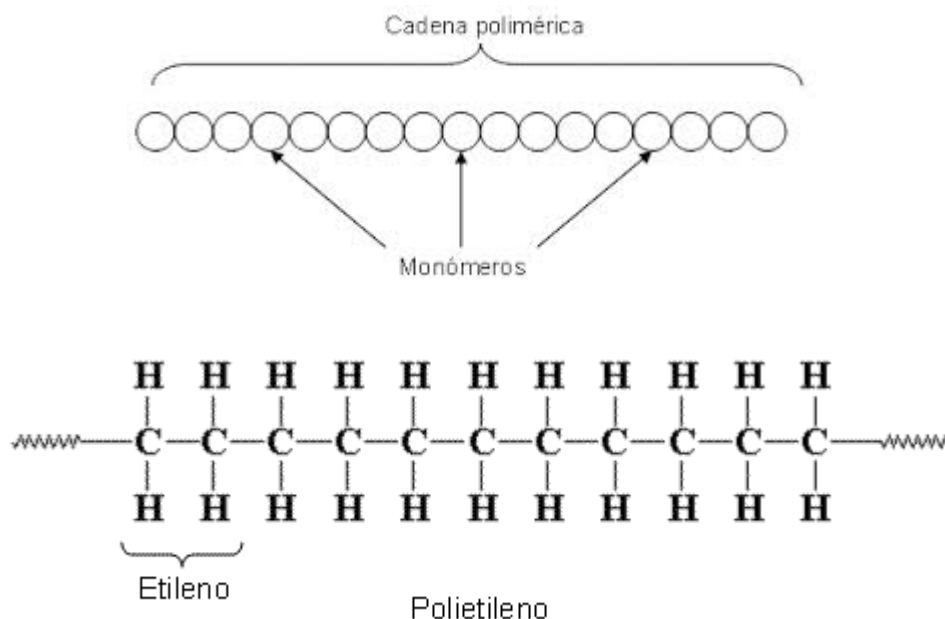
La constitución de una sustancia polimérica por regla general se describe en términos de sus unidades estructurales. Estas unidades reciben el nombre de unidades constitucionales repetitivas (UCR) [1], que se repiten a lo largo de la cadena polimérica de una manera más o menos ordenada formando moléculas de gran tamaño o macromoléculas.

Las unidades estructurales se unen unas con otras en la molécula polimérica, o estructura polimérica mediante enlaces covalentes. Esta estructura contribuye a la resistencia mecánica de la molécula y permanece inalterable en los procesos de transformación, a menos que exista una degradación. Aunque las estructuras poliméricas son muy variables, casi todos los casos pueden ser expresados como la combinación de un número limitado de diferentes UCR, y en la mayoría de los casos un único tipo de UCR es suficiente para la representación de la molécula polimérica completa. Esta característica, concretamente, la generación de la estructura completa a través de la repetición de una o varias unidades elementales, es la característica básica de las sustancias poliméricas, como ciertamente indica la etimología del término polímero, *poly* (mucho) y *mero* (parte, segmento).

El proceso químico por el cual se sintetiza un polímero se denomina polimerización. En este proceso, las unidades estructurales se conectan entre sí en un patrón constante. En el más simple de los polímeros, los polímeros lineales, las unidades estructurales se conectan entre sí en una secuencia lineal y quedan representados por la fórmula:



Donde, la unidad estructural principal está representada por A, y x es el *grado de polimerización*, o número de unidades estructurales en la molécula. El grupo A' puede ser o no idéntico al A'', pero nunca podrían ser idénticos con A. En vista a esta estructura básica el polímero se obtiene a partir de la reacción entre moléculas pequeñas llamadas monómeros para dar lugar a las macromoléculas (polímero) (Figura 3.1), para que las moléculas de monómero puedan generar polímero, necesariamente deben ser bivalentes, esto significa que presenten dos o más grupos funcionales, es decir, deben tener funcionalidad igual o superior a dos [2].

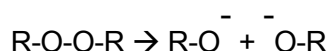


**Figura 3.1.** Representación esquemática de un polímero (arriba). Representación estructural de un polímero lineal (abajo) [3].

### 3.1.2. Polimerización

La polimerización se produce a través de una gran variedad de mecanismo de reacción que varían en complejidad debido a los grupos funcionales presentes en los monómeros y sus efectos estéricos. Existen muchos tipos de polimerización y varios sistemas para categorizarlos. Las categorías principales son: la polimerización por adición o reacción en cadena, y la policondensación (o reacción por etapas).

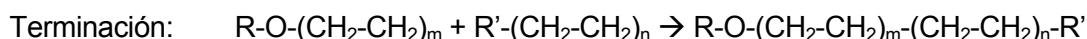
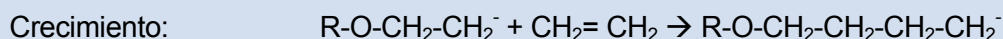
La **reacción en cadena (poliadición)** es la reacción de polimerización más común. Este tipo de polimerización es un proceso de tres etapas que involucra dos entidades químicas. El primero, conocido simplemente como monómero, puede ser considerado como una conexión en una cadena polimérica, que inicialmente existe como una unidad simple. En la mayoría de los casos, los monómeros poseen al menos un doble enlace carbono-carbono, el etileno ( $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ) es un buen ejemplo de monómero usado para formar polímeros simples. El segundo, es un reactivo químico denominado catalizador, en una reacción de poliadición, el catalizador puede ser un radical libre peróxido añadido en concentraciones relativamente bajas. Un radical libre es un compuesto químico que contiene un electrón libre que forma un enlace covalente con un electrón de otra molécula. La formación de un radical libre a partir de un peróxido orgánico se muestra en la siguiente ecuación:



En esta reacción química, dos radicales libres se forman a partir de una molécula  $\text{R}_2\text{O}_2$ .

El proceso de polimerización por reacción en cadena se realiza de acuerdo a tres pasos: iniciación, propagación y terminación (Figura 3.2). Estos pasos son brevemente descritos a continuación:

- 1) El primer paso en este proceso es la **iniciación**, ésta ocurre cuando el radical libre del catalizador reacciona con el enlace doble del monómero, comenzando la cadena polimérica. El enlace doble carbono-carbono se abre, el monómero forma un enlace con el radical libre, y el electrón libre se transfiere al átomo de carbono más alejado de la reacción.
- 2) El siguiente paso del proceso es la **propagación**, que es una operación repetitiva en la que se forma la cadena física del polímero. Los enlaces dobles de los sucesivos monómeros se abren cuando el monómero reacciona con la cadena polimérica. El electrón libre pasa sucesivamente a través de la cadena hasta el átomo de carbono más externo. Esta reacción ocurre de manera espontánea y continua debido a que la energía en el sistema químico es más baja a medida que la cadena crece. En términos termodinámicos, la suma de energías del polímero es más baja que la suma de las energías individuales de los monómeros, simplemente los enlaces simples en la cadena polimérica son más estables que los enlaces dobles de los monómeros.
- 3) La **terminación**, ocurre cuando otro radical libre ( $R-O^{\cdot}$ ), sobrante de la ruptura del peróxido orgánico, se encuentra con el final de la cadena en crecimiento. Éste radical libre termina la cadena uniéndose con el último  $CH_2$  que compone la cadena polimérica. Es entonces cuando la cadena polimérica está terminada. Adicionalmente también puede ocurrir que dos cadenas inacabadas (sin terminales) se encuentren y se unan, terminando así la reacción en cadena.



**Figura 3.2.** Polimerización por poliadición. Reacción de polimerización del etileno para obtener el polietileno [4]

Debido a las características del proceso de poliadición, el hecho que el polímero se desarrolle a partir de un centro activo, permite obtener polímeros de elevados pesos moleculares, siendo además una reacción exotérmica que ocurre de manera extremadamente rápida, formando cadenas individuales, a menudo en tiempos que no superan los 0,1 segundos. Así, el mecanismo de poliadición es el más utilizado en la industria, porque con una conversión relativamente modesta se obtienen polímeros de alto peso molecular. Algunos ejemplos de polímeros obtenidos por poliadición (Tabla 3.1) de uso frecuente son: el polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), policloruro de vinilo (PVC), poliacrilonitrilo (PAN), polimetacrilato de metilo (PMMA), polibutadieno (1,4-cis) (PB), entre otros.

**Tabla 3.1.** Polímeros de poliadición de uso frecuente. Se muestra su unidad constitucional repetitiva (UCR). [1]

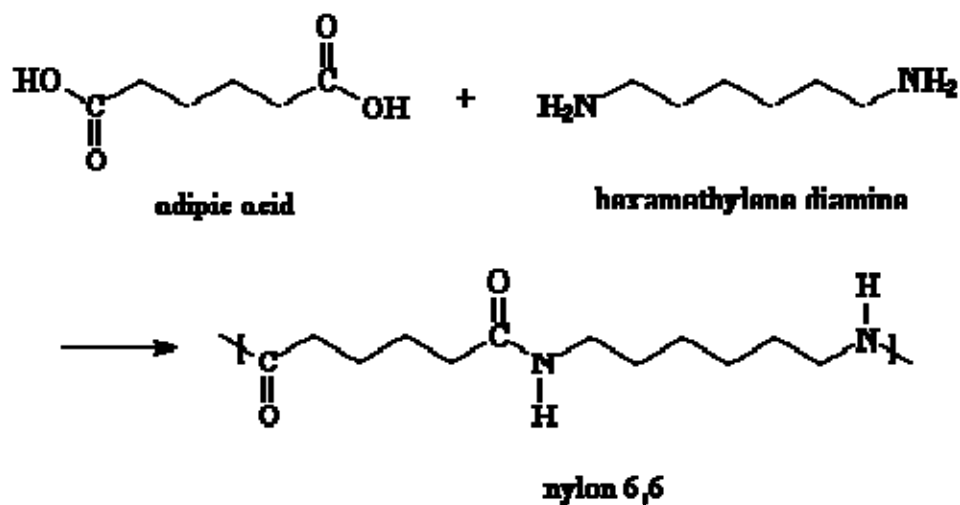
Polímero	Abreviatura	UCR
Polietileno	PE	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
Polipropileno	PP	$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-$
Poliestireno	PS	$-\text{CH}_2-\underset{\text{C}_6\text{H}_5}{\text{CH}}-$
Poli(cloruro de vinilo)	PVC	$-\text{CH}_2-\underset{\text{Cl}}{\text{CH}}-$
Poliacrilonitrilo	PAN	$-\text{CH}_2-\underset{\text{C}\equiv\text{N}}{\text{CH}}-$
Poli(metacrilato de metilo)	PMMA	$-\text{CH}_2-\underset{\text{COOCH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}}-$
Polibutadieno (1,4-cis)	PB	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$

La **polimerización de condensación (policondensación)** es otro mecanismo común de polimerización. Éste método de polimerización comúnmente produce polímeros de menor peso molecular que la poliadición y requiere temperaturas más altas para que ocurra.



A diferencia de la poliadición, la reacción de policondensación se basa en la reacción sucesiva de monómeros con moléculas polifuncionales, es decir, moléculas con funcionalidad superior o igual a dos, que reaccionan entre sí formando la cadena. Esta reacción produce pequeñas moléculas subproductos como agua, ácido clorhídrico, etc...

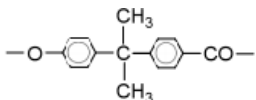
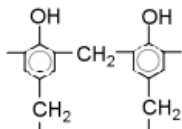
Para explicar el proceso de policondensación se toma como ejemplo uno de los polímeros más conocidos en la industria textil, el Nylon 66, descubierto por Wallace Hume Carothers en 1935, en el que los monómeros de hexametilendiamina (*hexamethylene diamine*) y el ácido hexanodioico o ácido adípico (*adipic acid*) son participantes, reaccionando entre sí para formar el dímero de Nylon 66 (Figura 3.3). Llegado a este punto, el polímero puede crecer en cualquier dirección a través de la unión de otra molécula de hexametilendiamina o ácido hexanodioico, o a otro dímero. Teóricamente este proceso puede continuar hasta que no existan disponibles más monómeros o terminaciones finales reactivas. El proceso, sin embargo, es relativamente lento y puede tomar desde varias horas a varios días. Típicamente este proceso produce cadenas lineales a no ser que se añada un monómero trifuncional.



**Figura 3.3.** Polimerización por policondensación. Reacción de polimerización del Nylon 66. [4]

Algunos de los ejemplos más típicos son las reacciones entre una diamina o un diol con un diácido carboxílico o monómeros diéster-diamina con derivados de ácidos. En la Tabla 3.2 se muestran algunos ejemplos de polímeros obtenidos por policondensación.

**Tabla 3.2.** Polímeros de policondensación de uso frecuente. Se muestra su unidad constitucional repetitiva (UCR). [1]

Polímero	Abreviatura	UCR
Poliéster	PE	$-\text{R}-\text{OCO}-\text{R}'-\text{COO}-$
Poliamida	PA	$-\text{NH}-\text{R}-\text{NHCO}-\text{R}'-\text{CO}-$
Policarbonato	PC	
Poli(etilen terftalato)	PET	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COO}-$
Poliuretano	PU	$-\text{NH}-\text{COO}-\text{R}-\text{OCO}-\text{NH}-\text{R}'-$
Resina de Fenol-formaldehído		

Para concluir este apartado, en la Tabla 3.3 se presentan las diferencias más significativas entre los mecanismo de polimerización por poliadición y policondensación descritos anteriormente.

**Tabla 3.3.** Diferencias entre los mecanismos de polimerización.

Poliadición	Policondensación
Sólo la reacción de propagación o crecimiento adiciona a la cadena una unidad repetitiva cada vez.	Cualquiera de las dos especies moleculares presentes puede reaccionar.
La concentración de monómero disminuye de modo continuo en el transcurso de la reacción.	El monómero desaparece al comienzo de la reacción, cuando el grado de avance es 10 queda menos del 1%.
Se forma rápidamente el polímero de alto peso molecular; el peso molecular cambia poco en el transcurso de la reacción.	El peso molecular del polímero aumenta continuamente durante la reacción.
Tiempos de reacción largos conducen a elevados rendimientos pero afectan poco al peso molecular.	Tiempos de reacción largos son esenciales para obtener pesos moleculares elevados.
La mezcla de reacción contiene solamente monómero, polímero de alto peso molecular, y unos $10^{-8}$ partes de radicales en crecimiento.	En cualquier momento todas las especies moleculares están presentes, y tienen una distribución calculable.

## 3.2. Estructura de los Polímeros

Para abordar el estudio de la estructura de los polímeros se suele diferenciar entre dos niveles, la estructura química y la estructura física. La estructura química se refiere a la construcción de la molécula individual y la estructura física al ordenamiento de las moléculas respecto a otras [1].

### 3.2.1. Estructura Química

La estructura química considera el efecto de la naturaleza de los átomos que constituyen la cadena principal y los sustituyentes de la misma, las uniones entre monómeros, el peso molecular y su distribución y el efecto de las ramificaciones o entrecruzamientos en la cadena principal. Asimismo, las diferentes configuraciones que pueden adoptar los sustituyentes de la cadena principal condicionan notablemente las propiedades de los polímeros y son parte de su estructura química.

#### 3.2.1.1. Tipos de átomos en la cadena principal y sustituyentes

En los polímeros las uniones entre monómeros se realiza siempre mediante enlaces covalentes, llamadas fuerzas de enlace primarias [1], que se definen como aquellas que contribuyen a la resistencia mecánica y permanecen inalterables en los procesos de transformación, a menos que exista degradación, las energías de estos enlaces son habitualmente superiores a 50 Kcal/mol. Sin embargo, las fuerzas responsables de la cohesión entre cadenas diferentes, o fuerzas de enlace secundarias [1] pueden ser de diversa naturaleza, y quedan subrogadas a las características de los átomos y los sustituyentes de la cadena principal. Siendo entonces aspectos como la polaridad y el volumen de estos átomos las características que determinarán propiedades como la flexibilidad del material, la temperatura de transición vítrea, la temperatura de fusión y la capacidad de cristalización, entre otras propiedades. Como fuerzas de enlace secundarias cabe destacar, las fuerzas de dispersión, las fuerzas de dipolo-dipolo y el puente de hidrógeno.

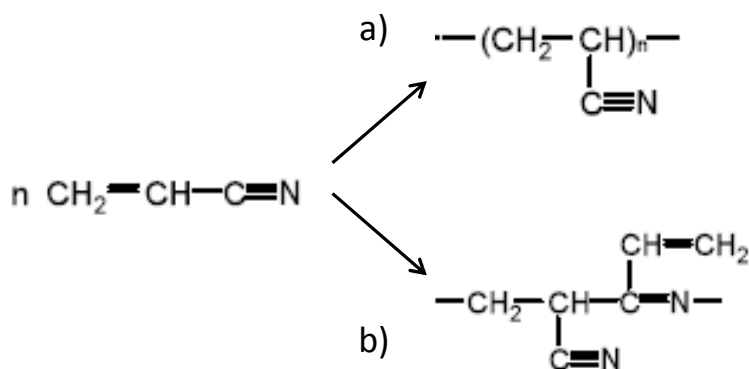
Las fuerzas de dispersión, actúan entre todos los átomos y moléculas como consecuencia de los momentos dipolares, variables con el tiempo, que surgen de las diferentes configuraciones instantáneas de electrones y núcleos. La energía de interacción es cercana a 2 Kcal/mol y es independiente de la temperatura. En el caso de la molécula de polietileno, molécula sencilla no polar, las cadenas diferentes se atraen entre sí por este tipo de fuerzas intermoleculares débiles, en consecuencia el polietileno es un material blando y posee una temperatura de fusión relativamente baja.

Para moléculas polares, tales como el PVC (poli(cloruro de vinilo)), resultan interacciones fuertes del tipo dipolo-dipolo resultantes de las atracciones electrostáticas entre cargas opuestas. La energía de interacción se sitúa entre 2 y 6 Kcal/mol, dependiendo además del alineamiento de los dipolos, lo que puede representar un polímero muy rígido. La interacción decrece con la temperatura ya que esta produce una desorientación molecular.

El enlace de hidrógeno es un tipo especial de interacción dipolo-dipolo, en el que las cadenas de moléculas altamente polares que contienen átomos de oxígeno o nitrógeno son atraídos hacia los átomos de hidrógeno que están ligados a átomos muy electronegativos como es el caso de los grupos hidroxilo, carboxilo, amina y amida. Estas interacciones pueden ser inter o intramoleculares y su energía varía entre 3 y 7 Kcal/mol

### 3.2.1.2. Uniones entre monómeros

En los procesos de polimerización por condensación los monómeros se unen unos con otros siempre de la misma forma, no siendo siempre así en la polimerización por adición. Por ejemplo, en la polimerización del metacrilonitrilo para dar poliacrilonitrilo (PAN) la mayoría de los monómeros polimerizan vía el doble enlace (Figura 3.4a). Si bien existe la posibilidad que una cantidad limitada de monómero lo haga vía el grupo nitrilo (Figura 3.4b).



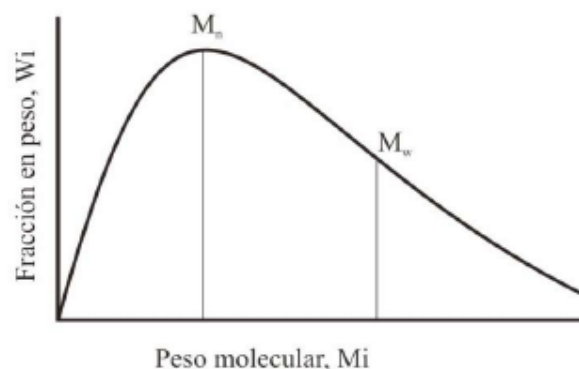
**Figura 3.4.** Uniones entre monómeros del poliacrilonitrilo (PAN). a) Monómeros unidos vía doble enlace (a), o vía el grupo nitrilo (b)

Los grupos químicos que resultan de estas reacciones son generalmente menos estables que los producidos por las uniones normales de dobles enlaces carbono-carbono. Aparecen así uniones débiles que pueden tener mucha importancia en la estabilidad térmica del polímero. También pueden formarse enlaces lábiles como consecuencia de uniones cabeza-cabeza o cola-cola en lugar de enlaces normales cabeza-cola.

### 3.2.1.3. Peso molecular y su distribución

Muchas de las propiedades de los polímeros, como pueden ser la resistencia mecánica, la elasticidad, la temperatura de transición vítrea, entre otros se deben al alto peso molecular de los mismos. Un ejemplo de este hecho es el etano; la molécula de etano es gaseosa, pero al aumentar su tamaño hasta 6 unidades se la encuentra como líquido, y a medida que se va adicionando monómero se convierte en un aceite, una cera y finalmente en un material sólido.

Los polímeros sintéticos y la mayoría de los naturales están formados por una mezcla de moléculas con diferentes grados de polimerización, y por lo tanto, con diferente peso molecular. En el caso de los polímeros sintéticos obtenidos por poliadición la longitud de la cadena viene determinada por el tiempo de crecimiento de la cadena. En el caso de las reacciones de policondensación, la longitud viene determinada principalmente por la disponibilidad local de grupos reactivos en los extremos de las cadenas en crecimiento. En ambos casos, los polímeros tienen una distribución de pesos moleculares como se representa en la Figura 3.5, que refleja una distribución típica de pesos moleculares.



**Figura 3.5.** Representación gráfica de la distribución típica de los pesos moleculares de un polímero.  $M_n$  y  $M_w$  corresponden al peso molecular en número y en peso, respectivamente.

Los valores medios más importantes utilizados para representar el peso molecular de un polímero son:

- El peso molecular en número,  $M_n$  (media aritmética):

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

- El peso molecular en peso  $M_w$  (media cuadrática):

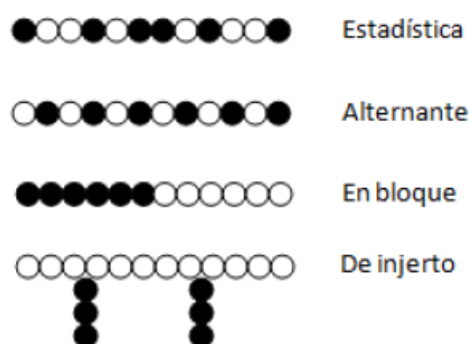
$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

donde  $N_i$  representa el número de moles de las especies  $i$  de peso molecular  $M_i$ .

La relación  $M_w/M_n$  se utiliza frecuentemente como medida de la heterogeneidad de la distribución del peso molecular de un polímero y se conoce como índice de polidispersidad ( $n$ ). Esta relación es la unidad para polímeros monodispersos ( $M_w=M_n$ ), aumentando su valor cuando se hace más amplia la distribución. El índice de polidispersidad suele tomar valores entre 1.5 y 3, pero ocasionalmente (dependiendo del tipo de polimerización) puede alcanzar hasta valores del orden de 25.

#### 3.2.1.4. Copolímeros

Cuando en un proceso de polimerización se utilizan dos o más polímeros químicamente diferentes, el polímero resultante se denomina copolímero. Los copolímeros, según la disposición relativa de los distintos monómeros, se clasifican como copolímeros en bloque, de injerto, alternantes y al azar o estadística. Estos tipos de copolímeros son mostrados en la Figura 3.6.



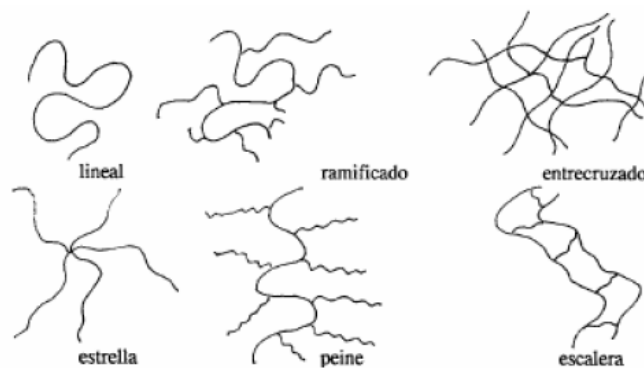
**Figura 3.6.** Tipos de copolímeros de acuerdo a la disposición relativa de los monómeros

#### 3.2.1.5. Ramificaciones y entrecruzamientos

Cuando durante las reacciones de polimerización no existen reacciones secundarias se obtienen polímeros lineales como el que se muestra representado en la Figura 3.7. Bajo

ciertas condiciones se pueden obtener ramificaciones que pueden ser cortas, largas, o entrecruzadas. Así, según la morfología de la cadena principal, los polímeros se pueden clasificar como:

- Lineales, aquellos polímeros que no presentan más ramas que no sean aquellas correspondientes a los grupos laterales.
- Ramificados, existen cadenas más o menos largas que emergen de manera estocástica de la cadena principal.
- Entrecruzados o reticulados: las ramificaciones entrelazan cadenas, de manera que el conjunto puede considerarse como una molécula de tamaño ilimitado.
- Peine, las cadenas laterales presentan una longitud similar y se hallan dispuestas con cierta regularidad.
- Estrella, las ramificaciones emanan de una misma unidad central.
- Escalera, formados por una sucesión regular de ciclos (esqueletos de doble cadena)



**Figura 3.7.** Tipos de polímeros de acuerdo a sus ramificaciones y entrecruzamientos

Estas estructuras morfológicas, polímeros lineales con o sin ramificaciones, y polímeros entrecruzados se corresponden a los grupos de materiales que se clasifican según su comportamiento térmico-mecánico en termoplásticos, elastómeros y termoestables.

- Los materiales termoplásticos son básicamente polímeros lineales no entrecruzados, pudiendo reblandecerse y fundirse por calentamiento y tomar una forma determinada, forma que mantienen una vez fríos. Se subdividen en:

- Amorfos, no cristalizan por tener estructuras altamente asimétricas, ramificaciones, grupos laterales de elevadas dimensiones, etc.
- Semicristalinos: Existen zonas donde las moléculas presentan un ordenamiento (cristalinas).
- Los elastómeros están constituidos por moléculas reticuladas de malla poco tupida. Presentan una consistencia elástica y gomosa que se pierde a temperaturas muy bajas. No son termoconformables, ni soldables a diferencia de los termoplásticos.
- Por otro lado, los materiales termoestables, debido a su estructura entrecruzada, no funden y son insolubles. En la práctica, para poder dar forma a estos materiales se parte de un intermedio (plástico termoendurecible) que todavía es capaz de fundir teniendo lugar la polimerización y el entrecruzamiento en el propio proceso de toma de forma.

#### **3.2.1.6. Configuración**

La configuración se refiere a la disposición relativa de los átomos en el espacio fijada por los enlaces covalentes, en definitiva es la ordenación en el espacio de los sustituyentes alrededor de un átomo en particular. La configuración óptica o tacticidad se categoriza en atáctico si todos los grupos sustituyentes se encuentran aleatoriamente a un lado u otro de la cadena, isotáctico si se encuentran en el mismo lado de la cadena y sindiotáctico si se encuentran alternadamente a un lado u otro de la cadena, en la Figura 3.8 se muestran las diversas configuraciones que puede tomar el polipropileno; éstas influyen directamente en las propiedades del polímero.

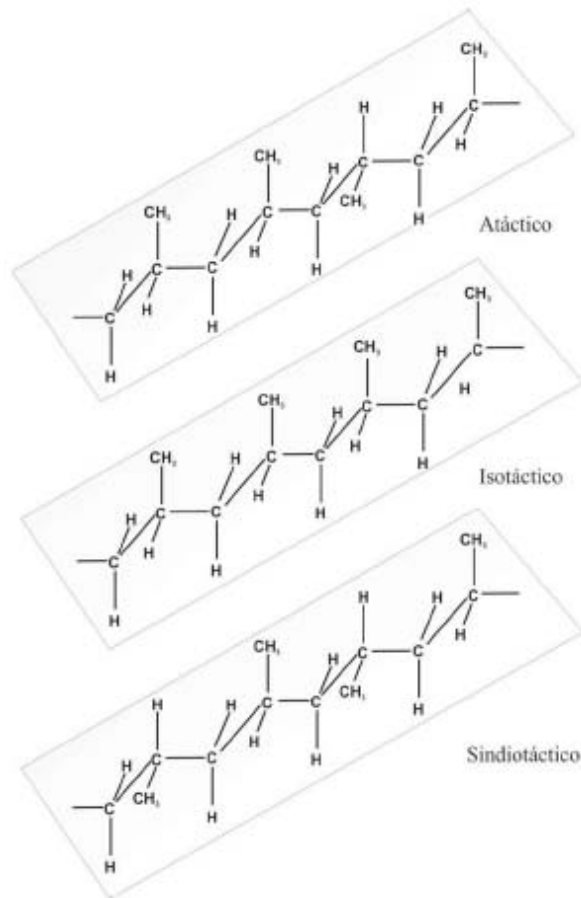
### **3.2.1. Estructura física**

La estructura física del polímero se trata básicamente de la orientación y cristalinidad que dependen en gran medida de la estructura química y a su vez condicionan el comportamiento del material durante el procesado y durante su vida útil.

#### **3.2.1.1. Estado amorfo y estado cristalino**

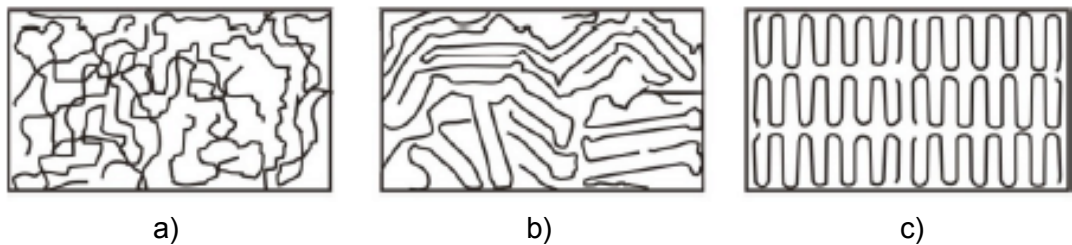
Los estados amorfo y cristalino se utilizan para indicar las regiones ordenadas y desordenadas de los polímeros, respectivamente, en la Figura 3.9 se muestra un esquema de un sistema amorfo, uno semicristalino y otro cristalino.





**Figura 3.8.** Configuraciones del polipropileno

Los polímeros con capacidad de cristalizar son aquellos cuyas moléculas son química y geoméricamente regulares en su estructura. Las irregularidades ocasionales, tales como las ramificaciones de la cadena limitan el alcance de la cristalización. Por el contrario los polímeros no cristalinos típicos son aquellos en los que existe una clara irregularidad en la estructura: polímeros ramificados, polímeros atácticos y copolímeros con cantidades significativas de dos o más constituyentes monoméricos bastante diferentes.

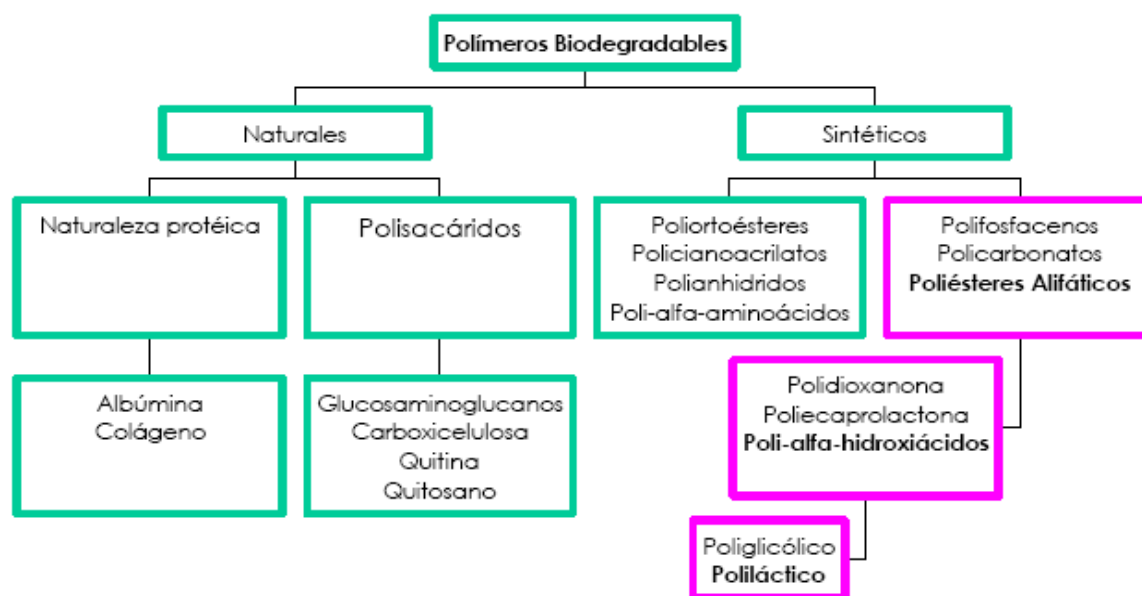


**Figura 3.9.** Esquemas de la estructura física de los polímeros. a) Polímero amorfo. b) Polímero semicristalino. c) Polímero cristalino.

### 3.3. Polímeros biodegradables

En este apartado se describen aspectos relacionados a los polímeros biodegradables con aplicación en el área biomédica. Actualmente, existen numerosos polímeros utilizados en el campo biomédico; algunos de ellos son estables, y son utilizados para aplicaciones permanentes, como el poli(metil metacrilato) (PMMA), o el polietileno (PE). En los últimos años, se han introducido los polímeros biodegradables, para aplicaciones temporales. Estos materiales tienen la capacidad de ser compatibles con el tejido y de degradarse cierto tiempo después de ser implantados, dando lugar a productos que no son tóxicos y pueden ser eliminados o metabolizados por el organismo. En general, este grupo está representado por los polímeros biodegradables, aunque existen ciertos materiales cerámicos que también son reabsorbibles.

Los materiales biodegradables deben cumplir algunas características para ser utilizados como implantes en el organismo humano, por ejemplo, los materiales y sus sub-productos no deben ser mutagénicos, carcinogénicos, antigénicos, tóxicos y, lógicamente deben ser antisépticos, esterilizables, compatibles con el tejido receptor, de fácil procesado y capaz de conformarse en distintas formas entre otros requisitos. Actualmente, una gran parte de la investigación en el área de los polímeros para aplicaciones biomédicas se encuentran dirigidas al desarrollo de polímeros sintéticos biodegradables. En la Figura 3.10 se muestran las familias de polímeros biodegradables de mayor aplicación en el área biomédica.



**Figura 3.10.** Polímeros biodegradables utilizados en aplicaciones biomédicas

Según la naturaleza de los polímeros biodegradables, existen dos grandes familias: los polímeros de origen sintético (p.e., el poliláctico), y los de origen natural (p.e., colágeno o dextrano).

Los primeros polímeros degradables de origen sintético y los más comúnmente utilizados son los obtenidos a partir del ácido poliglicólico (PGA) y del ácido poliláctico (PLA), para ambos se han desarrollado una multitud de usos en la industria biomédica, comenzando con las suturas biodegradables que fueron aprobadas en 1960. Desde entonces numerosos dispositivos basados en PGA y PLA han sido desarrollados. Luego, otros materiales, como la polidioxanona, politrimetilen-carbonato en forma de copolímeros y homopolímeros y copolímeros de poli( $\epsilon$ -caprolactona) han sido aceptados como materiales de uso biomédico. Adicionalmente a estos materiales, se encuentran los polianhídridos, los poliortoésteres y otros que actualmente se encuentran bajo investigación.

Los polímeros biodegradables más utilizados en la actualidad son poliésteres, poliesteramidas, polifosfacenos, ésteres de polifosfato, polianhídridos, polímeros naturales y mezclas de polímeros. Dado que este Proyecto se centra en los poliésteres y en las poliesteramidas, en el apartado 3.4 y 3.5 respectivamente se presentan las características de cada una de estas familias de polímeros.

### 3.3.1. Degradación

En la Tabla 3.4 se muestran los tiempos de degradación de algunos de los polímeros biodegradables mencionados anteriormente. Debe tenerse en cuenta que la biodegradación depende del tamaño del implante, de su forma, densidad, lugar de implantación y peso molecular del polímero empleado.

## 3.4. Poliésteres

Los poliésteres son una categoría de elastómeros que contienen el grupo funcional éster (-COO-) en su cadena principal. Las propiedades de estos se rigen por la proporción de grupos éster en su estructura y por la geometría, polaridad y movilidad de sus unidades repetitivas. Los poliésteres lineales se pueden clasificar en alifáticos y poliésteres que contienen unidad aromáticas

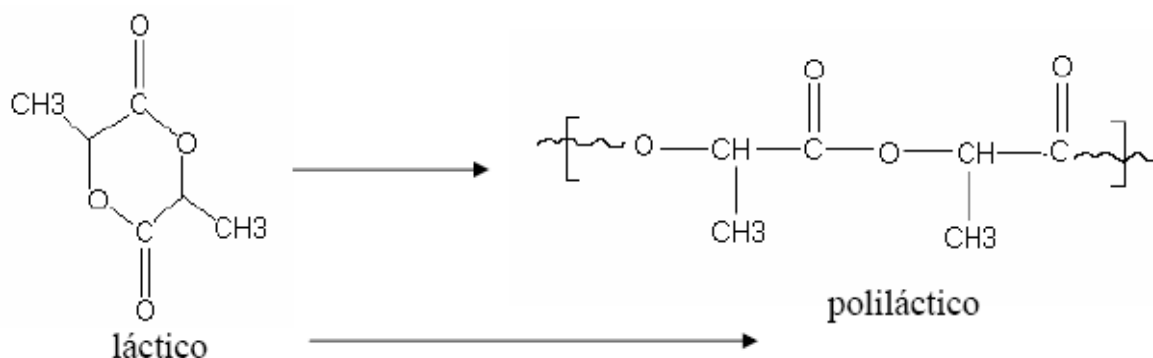
El ácido poliláctico, PLA, es un polímero termoplástico, amorfo o semicristalino, que ha sido ampliamente estudiado en aplicaciones como la liberación controlada de fármacos,

suturas biodegradables y diferentes implantes para la fijación de fracturas y para la elaboración de dispositivos vasculares.

**Tabla 3.4.** Tiempo de degradación de algunos polímeros biodegradables

Polímero	Tiempo de eliminación [meses]
Poliácido D-Láctico	12-16
Poliácido L-Láctico	18-24
Copolímero de ácido glicólico y láctico	6-12
Policaprolactona	18-24
Poliglicol	2-4
Polihidroxibutirato	18-24
Poliésteres de fosfato	12-24
Poliortoésteres	12-24
Polianhidridos de alcanos	0,2-4
Polianhidridos aromáticos	6-12
Gelatina	0,2-1
Celulosa oxidada	0,2-1
Colágeno	0,2-1
Pseudopoliaminoácidos	2-24
Poliiminocarbonatos	4-12
Poliácido D-Láctico	6-18
Poliácido L-Láctico	12-24

a) *Síntesis*. La síntesis del ácido poliláctico fue estudiada por Carothers en 1932. Generalmente, se lleva a cabo la polimerización por apertura de anillo del diéster cíclico (Figura 3.11). Diferentes compuestos metálicos, organometálicos e inorgánicos de Zn y estaño han sido usados como iniciadores. Sin embargo, el tetrafenil de estaño, cloruro estañoso y octato estañoso son los más efectivos.



**Figura 3.11.** Síntesis del ácido poliláctico

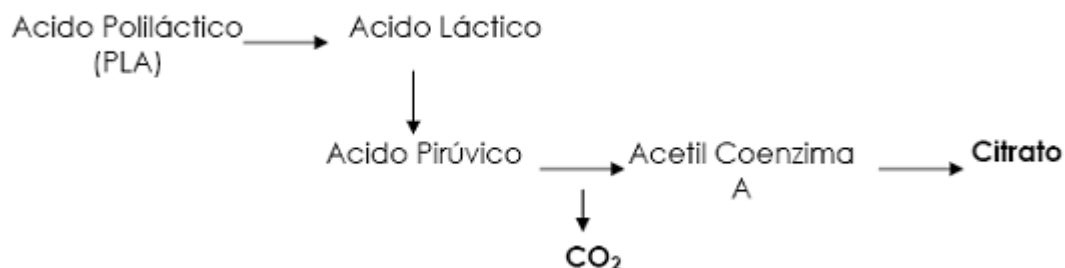
b) *Propiedades*. Algunas de las propiedades térmicas del PLA son mostradas en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** Algunas propiedades del ácido poliláctico en comparación con el acero y el hueso cortical.

Material	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	E (GPa)	Tiempo Degradación(meses)
L-PLA	173-178	60-65	2,7	> 24
DL-PLA	Amorfo	55-60	1,9	12-16
Hueso			10-20	
Acero			210	

c) *Biocompatibilidad*. Debido a que el ácido láctico es un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos en nuestro organismo, el uso de este hidroxiaácido es generalmente visto como la situación ideal desde el punto de vista toxicológico. Los poliésteres alfa, como el PLA se degrada inicialmente por hidrólisis y su degradación puede

ser acelerada in-vivo por la presencia de enzimas, lo cual conlleva a la liberación de sus respectivos monómeros (ácido láctico). Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación y da inicio a la ruta metabólica (Figura 3.12).



**Figura 3.12.** Esquema de degradación del ácido poliláctico en el organismo

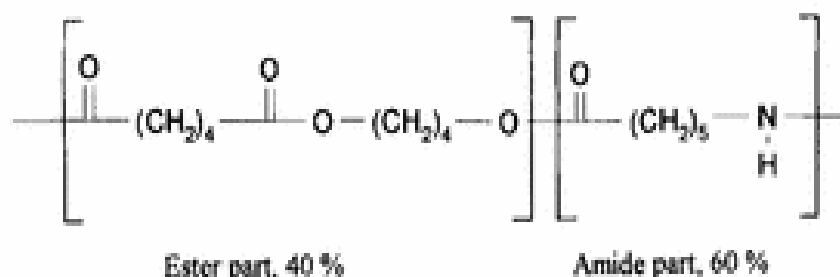
La ruta metabólica del ácido láctico comienza con la transformación de lactato a piruvato por la acción de la enzima lactato dehidrogenasa, una vez convertido en piruvato, éste sufre una decarboxilación oxidativa para producir Acetilcoenzima A. Esta molécula puede entrar en el ciclo del ácido tricarboxílico (o ciclo del ácido cítrico), el cual se lleva a cabo a nivel mitocondrial obteniéndose como resultado ATP por fosforilación oxidativa más agua y dióxido de carbono, los cuales son eliminados en la respiración y excretados por los riñones.

### 3.5. Poliésteramidas

Las poliésteramidas (PEA) [5] corresponden a una familia de polímeros degradables que aún mantienen un reducido consumo. Sin embargo, existen algunas PEAs comerciales, tales como BAK1095<sup>®</sup> y BAK2195<sup>®</sup>, ambas de Bayer. BAK1095 es un copolímero constituido por ácido adípico, 1,4-butanodiol y caprolactama, cien por ciento biodegradable, con buenas propiedades y fácil procesado (Figura 3.13). BAK2195 se basa en el ácido adípico y la hexametilendiamina como componente amida, y el ácido adípico con butanodiol y etilenglicol como componentes éster.

Estos BAK han tenido aplicaciones en horticultura, agricultura, sectores alimenticios y como bolsas de basura. Es un termoplástico semicristalino, transparente, que se degrada en

condiciones aeróbicas formando agua, monóxido de carbono y biomasa. Su velocidad de degradación es comparable a los materiales orgánicos que se descomponen bajo condiciones de compostaje.



**Figura 3.13.** Copolímero al azar BAK1095 sintetizado de monómeros como ácido adípico, butanodiol, y ácido aminocaproico. El 40% del polímero corresponde a una parte éster y el 60% de amida.

Tal y como indica su nombre, las poliesteramidas son polímeros que contienen enlaces tipo éster (-COO-) y enlaces tipo amida (-CONH-) en la cadena principal. Los primeros estudios con poliesteramidas biodegradables datan de 1979 y se realizaron con polímeros obtenidos mediante el intercambio amida-éster que se produce al someter una poliamida y un poliéster a elevada temperatura (270°C).

Las poliesteramidas pueden englobarse en diferentes familias de la siguiente forma:

- Polipeptidos. Son poliesteramidas constituidas por α-aminoácidos y α-hidroxiácidos.
- Poliesteramidas basadas en monómeros de nilones y poliésteres comerciales. La síntesis y caracterización de copolímeros estadísticos constituidos por los monómeros del nylon 6 o del nylon 6 6 y la policaprolactona ha sido ampliamente estudiada por los grupos de Gonsalves y Arvanitoyannis.
- Poliesteramidas derivadas de carbohidratos.

Entre las PEAs de mayor interés científico destacan aquellas derivadas de α-aminoácidos debido a su gran susceptibilidad hacia la degradación con enzimas proteolíticas. Además, estos PEAs son materiales sintéticos de interés biomédico debido a la presencia de componentes naturales; sin embargo, en la práctica tienen poca utilidad debido a su alta cristalinidad y difícil procesabilidad. Adicionalmente, se debe considerar el hecho que polímeros constituidos por más de tres aminoácidos pueden producir respuesta inmune con producción de anticuerpos, y por lo tanto su aplicación en seres humanos podría ser limitada.

Como una estrategia para salvar este problema se ha estudiado diferentes copolímeros constituidos por  $\alpha$ -aminoácidos, p.e. los derivados de la tirosina y policarbonatos que suelen ser utilizados como implantes ortopédicos debido a su elevada resistencia mecánica.

Análogamente a las poliamidas y poliésteres, las PEAs pueden clasificarse en alifáticas y aromáticas en función de la naturaleza de los monómeros utilizados. Como se ha mencionado anteriormente, su principal característica química es la presencia en la cadena principal de grupos amida ( $-\text{NH}-\text{CO}-$ ) y éster ( $-\text{CO}-\text{O}-$ ). Existen pocos trabajos relacionados al análisis estructural de las PEAs. Cesari et al. (1976) estudiaron por difracción de rayos-x algunas PEAs derivadas de hexanodiol, hexametildiamina y ácido ftálico. Estas PEAs cristalizan según celdillas triclinicas donde las cadenas moleculares se unen por puentes de hidrógeno entre los grupos amida formando láminas. La conformación de la cadena molecular muestra una ligera desviación de la conformación completamente extendida, particularmente por la rotación de los grupos amida y éster (aproximadamente de  $26^\circ$  y  $15^\circ$ , respectivamente) con respecto al plano del anillo aromático. El empaquetamiento cristalino de las poliesteramidas corresponde a una celdilla triclinica similar a la descrita para el polietilentereftalato (PET).

Recientemente, en el grupo de investigación PSEP (Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España) se ha determinado la estructura cristalina de una serie de PEAs alifáticas derivadas de glicina, hexanodiol y ácidos dicarboxílicos con un número variado de metilenos (Paredes et al., 1999). Los resultados indican que pueden obtenerse dos tipos de empaquetamiento cristalino: celdillas constituidas por seis o dos láminas. En todos los casos, sin embargo, los puentes de hidrógeno se establecen según una única dirección. Estas superestructuras constituidas por seis láminas fueron explicadas en base a las distintas preferencias energéticas de los grupos amida y éster.

### **3.6. Aplicaciones biomédicas de los polímeros biodegradables**

Actualmente existen diversos polímeros biodegradables comercializados para aplicaciones biomédicas a corto plazo. Otros posibles usos se encuentran aún en fase de investigación. Una de las aplicaciones más ampliamente estudiada de los polímeros biodegradables es su uso como dispositivo portador para la liberación controlada de fármacos. Las suturas son una de las más antiguas y más importantes aplicaciones de los polímeros biodegradables. Otras aplicaciones actuales incluyen los dispositivos de fijación ortopédicos, coberturas de heridas, guías nerviosas y, venas y arterias artificiales entre otras.



Todas estas aplicaciones pueden agruparse en cuatro categorías: suturas quirúrgicas, barreras temporales, dispositivos de liberación controlada y andamios temporales (“temporary scaffolds”).

### **3.6.1. Suturas quirúrgicas**

Las suturas a base de polímeros sintéticos degradables constituyen la aplicación más importante de estos materiales en el campo de la medicina humana. La cantidad de polímeros utilizados en este campo supera ampliamente la suma empleada en el resto de aplicaciones en biomedicina. Las primeras suturas de este tipo de material fueron las de poli (ácido glicólico) y se comercializaron en 1970 bajo el nombre comercial de Dexon<sup>TM</sup> [6,7]. Se trata de un área muy consolidada en la que no se esperan innovaciones de nuevos productos en un futuro próximo.

En la mayoría de las intervenciones quirúrgicas se requiere el uso de una sutura para ayudar a sujetar y mantener los tejidos y órganos durante los primeros días de curación. Las suturas multifilamento están formadas por múltiples fibras trenzadas ó torsionadas que proporciona al hilo una adecuada flexibilidad y una gran facilidad de manipulación por el cirujano. Sin embargo, sus irregularidades superficiales suelen provocar el denominado ‘efecto sierra’ o arrastre de tejidos al atravesar órganos delicados. Asimismo, en su uso existe un no despreciable riesgo de infección debido a la facilidad que tienen las bacterias para alojarse en los pequeños huecos existentes entre las fibras de la superficie del hilo. La tendencia actual es la utilización de suturas monofilamento, constituidas por un único hilo y que se consideran más cercanas al modelo de “sutura ideal”. Las suturas monofilares generalmente no presentan “efecto sierra”, tampoco tienen la capilaridad de las trenzadas, y esta carencia reduce el riesgo de proliferación bacteriana en una herida infectada. Sin embargo, son menos flexibles y difíciles de anudar por el cirujano.

### **3.6.2. Barreras temporales**

Este tipo de dispositivos se aplican mayoritariamente como prevención a la adhesión entre tejidos tras el acto quirúrgico. Si esta adhesión, no natural, no es impedida pueden originarse graves complicaciones. La barrera temporal adopta la forma de una fina película polimérica o malla y se coloca entre los tejidos adyacentes en el momento de la intervención quirúrgica [6,8], manteniendo separado el tejido dañado durante el proceso de cicatrización. Por lo tanto, estos materiales deben ser suficientemente flexibles y resistentes para mantenerse recubriendo el tejido blando dañado, y deben biodegradarse cuando el tejido se encuentre completamente regenerado.

Los dispositivos de tipo barrera temporal pueden también servir como base para el desarrollo de piel artificial, para el tratamiento de quemaduras u otras lesiones cutáneas

[6,8]. De hecho, esta aplicación se ha investigado extensamente, llegando a ser el primer producto de ingeniería de tejidos comercialmente disponible.

### **3.6.3. Dispositivos de liberación de fármacos**

La idea de liberación controlada de fármacos data de los años 60 en los que se desarrolló el empleo de goma de silicona y polietileno como matrices poliméricas de liberación. La falta de degradabilidad de estos materiales, implicaba la extracción quirúrgica del dispositivo por lo que su aplicabilidad quedaba limitada. Fue en la década de los años 70 cuando se sugirió que el empleo de polímeros biodegradables podría evitar dicha intervención. El uso de microcápsulas de polímero fue propuesto por Chang en 1964 y la degradación fue incorporada por Manson [et al.] en 1976, mediante el empleo de una cobertura de polímero biodegradable.

Los dispositivos de liberación controlada de fármacos son diseñados para liberar un agente bioactivo en un lugar específico y a una determinada velocidad, facilitando la dosis óptima y la duración del tratamiento y, en consecuencia, reduciendo la frecuencia de la dosis. Por lo tanto, estos dispositivos minimizan las molestias e incluso los posibles daños al paciente y mejoran potencialmente la salud humana. Han sido estudiadas aplicaciones en varias terapias [9,10], medicamentos contra el cáncer, agentes antiinflamatorios, factores de crecimiento y anticonceptivos, por ejemplo. Son ejemplos bien conocidos el uso habitual de parches que contienen nitroglicerina o anticonceptivos, fármacos que se absorben a través de la piel.

Una amplia gama de polímeros degradables [6,8] de origen natural y sintético se pueden utilizar para la producción de sistemas de administración de fármacos. Junto con la amplia gama de agentes bioactivos que pueden ser incorporados, los diversos tamaños y formas y los medios posibles de administración, han hecho posible que este tipo de sistemas sean capaces de utilizarse en muchas aplicaciones terapéuticas.

### **3.6.4. “Temporary scaffolds” (andamios temporales)**

Se denominan “temporary scaffolds” los dispositivos empleados en medicina cuando los tejidos naturales han sido debilitados por enfermedad, lesión o cirugía y requieren algún soporte artificial hasta que sanen y recuperen su forma y resistencia característica. Un ejemplo representativo del uso de “temporary scaffolds” es el empleo de polímeros biodegradables en odontología [7]. Es práctica habitual, la utilización de partículas poliméricas porosas como relleno del hueco originado tras la extracción dental, para acelerar el proceso de cicatrización del hueso de la mandíbula.

Los dispositivos ortopédicos de fijación [6-8] son otro ejemplo de aplicación en la que los polímeros biodegradables pueden proporcionar soporte temporal, con la ventaja adicional

respecto a los implantes de metal de permitir una transferencia de carga progresiva al tejido en fase de regeneración. Sin embargo, los polímeros biodegradables actuales no tienen resistencia suficiente para ser utilizados como placas óseas en huesos largos como el fémur, o en otras aplicaciones de sustento de carga. No obstante, han sido utilizados en otras aplicaciones con menos requerimientos de propiedades mecánicas, como por ejemplo tornillos de interferencia en el tobillo, rodilla o mano, tachuelas y pasadores para la unión de ligamentos y la reparación del menisco, y varillas y pasadores para la fijación de fracturas.

Los injertos vasculares y endoprótesis biodegradables son otros ejemplos de dispositivos temporales que en este caso se utilizan cuando se daña un vaso sanguíneo. Hoy en día, solo se dispone de dispositivos experimentales para este tipo de aplicación donde la compatibilidad con la sangre es de máxima importancia.

Actualmente, el término “biodegradable scaffold” se asocia específicamente a materiales de estructura tridimensional y porosa, que sirven de soporte para el crecimiento celular in vitro, con el fin de construir un sustituto biológico para un órgano o tejido que ha perdido su función [6-8, 11]. Esta aplicación de los polímeros biodegradables constituye la base de la ingeniería de tejidos, que es en la actualidad una de las áreas más interesantes de la investigación biomédica [7,11].

### **3.7. Polímeros biodegradables e ingeniería de tejidos**

A pesar de los recientes avances tecnológicos, miles de personas mueren cada año a la espera de un trasplante debido a la gravedad en su órgano dañado o a la falta de un donante adecuado. Aunque los médicos han tratado de sustituir la función de los órganos dañados mediante aparatos mecánicos, electrónicos (diálisis y máquinas bypass de corazón-pulmón), o mediante el implante con sustitutos sintéticos (conjunto de vasos sanguíneos y sustitutos), éstas a menudo son sólo soluciones temporales y no permiten que el paciente pueda reanudar completamente sus actividades normales. La infección y el rechazo son también serias preocupaciones en esos procedimientos.

El emergente campo de la ingeniería de tejidos podría ayudar a resolver muchos de estos problemas. En las últimas tres décadas, con la aplicación de la tecnología de materiales convencionales se han conseguido avances importantes en el reemplazo de órganos y tejidos en organismos. Sin embargo, todavía no existen materiales que puedan reemplazar o ayudar adecuadamente a la regeneración de tejidos funcionales tales como huesos o grandes segmentos de huesos. En una población que envejece cada vez más, el mal funcionamiento o la pérdida de tejido debidos a una lesión o a una enfermedad ha conducido a una reducción de la calidad de vida de muchos pacientes y además ha involucrado importantes costes sanitarios.

El término ingeniería de tejidos fue definido inicialmente por los asistentes al primer meeting patrocinado por la NSF (National Science Foundation, EE.UU.), en 1988, como la *“aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia la comprensión fundamental de la relación función-estructura en condiciones normales y los tejidos de los mamíferos y el desarrollo de sustitutos biológicos para la reparación o regeneración de tejidos o funciones orgánicas [12]”*. En 1993, después de resumir las primeras creaciones en este campo, Langer y Vacanti [10], los llamados ‘padres’ de esta rama de la ciencia, definieron la ingeniería de tejidos como *“un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida al desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función tisular”*.

La ingeniería de tejidos ofrece la posibilidad de facilitar la regeneración del tejido dañado por enfermedad o lesión y, en algunos casos, de crear un nuevo tejido y reemplazar órganos con disfunciones. Esto se consigue con el uso de materiales biodegradables que inducen el crecimiento celular y que sirven como matrices temporales de las células trasplantadas. La función del material es temporal pero crucial para el éxito de la estrategia, por lo que la selección de material es crítica.

La ingeniería de tejidos ha creado un nuevo campo de aplicación para los polímeros biodegradables, abriendo camino al desarrollo de nuevas clases de biomateriales tanto de origen sintético como natural y al diseño de nuevos formatos de materiales para tejidos híbridos. Aunque los resultados preliminares son prometedores con polímeros de origen natural, la preocupación por la viabilidad de encontrar la gran cantidad de material necesario para su uso clínico, ha inducido a los investigadores el empleo preferente de polímeros sintéticos. Estos materiales pueden ser fácilmente producidos en masa y sus propiedades pueden ser adaptadas para aplicaciones específicas. Además, el empleo de polímeros degradables elimina la necesidad de un segundo acto quirúrgico para extraer el implante [14].

El requisito de biodegradabilidad excluye el uso de todos los metales y de la mayoría de cerámicas como materiales para la aplicación como “scaffold” [15,16]. Aunque se han empleado con éxito algunos materiales cerámicos biodegradables y bioabsorbibles como el fosfato tricálcico y el coral marino, poseen limitaciones ya que son frágiles y difíciles de transformar en materiales porosos con formas complejas. Por el contrario, los polímeros son materiales dúctiles y fáciles de moldear. Sin embargo, aunque existe una cierta variedad de polímeros disponibles para aplicaciones biomédicas, el campo emergente de la ingeniería de tejidos está creando una nueva demanda de estos materiales, ya que los requerimientos en esta área son específicos y no quedan cubiertos por la mayoría de los polímeros biodegradables actuales.

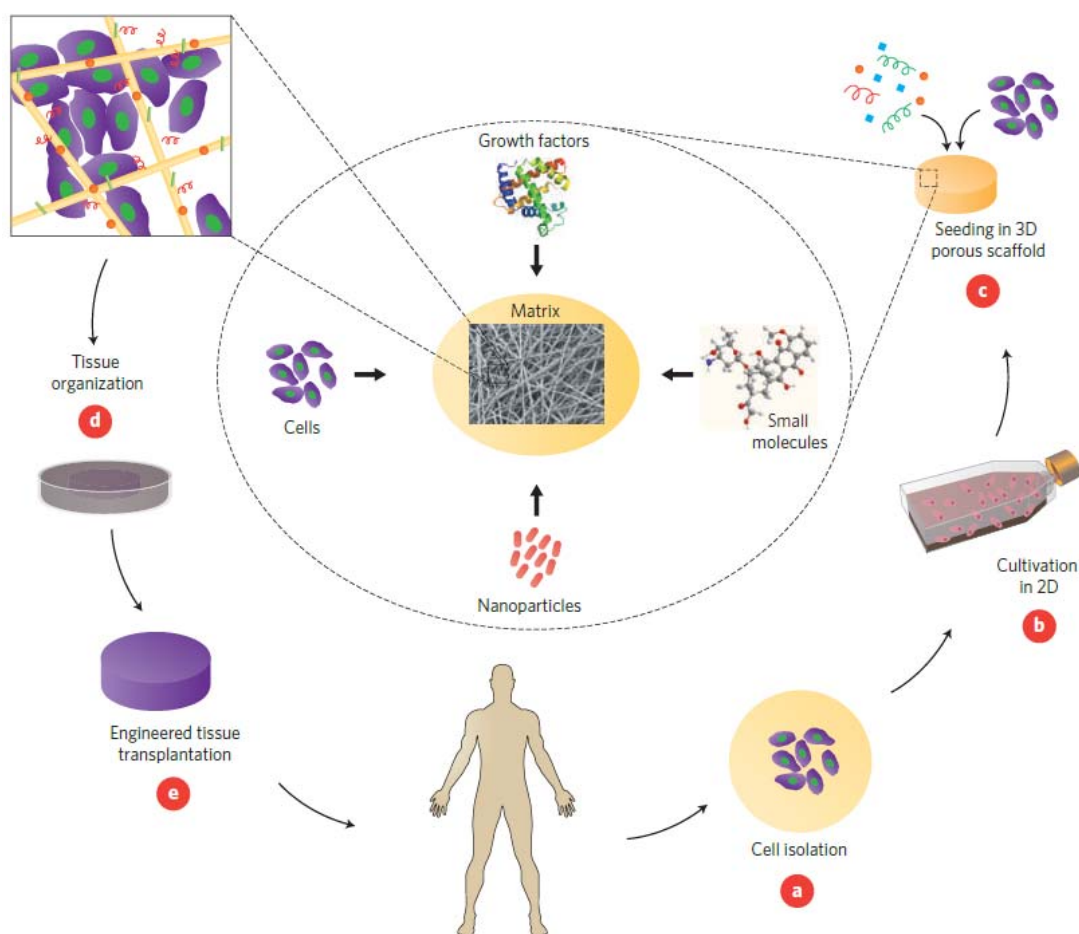
En la selección del material a utilizar como sustrato, es imperativo elegir uno que exhiba buena biocompatibilidad. Esto significa que el material no debe provocar una elevada respuesta inflamatoria, ni mostrar una extrema inmunogenicidad o citotoxicidad. Además, las propiedades mecánicas de éstos materiales sustratos (scaffolds), deben ser suficientes para mantener su integridad durante las actividades normales del paciente. Al igual que con todos los materiales en contacto con el cuerpo humano, estos andamios deberán ser fácilmente esterilizables para prevenir la infección [14]. En la mayoría de las aplicaciones, los scaffolds deben proporcionar zonas para el anclaje celular, estabilidad mecánica y orientación estructural; además de una adecuada interfaz para responder a cambios fisiológicos y biológicos, para promover la integración con el tejido nativo del entorno. La formación de tejido nuevo está profundamente influenciada por el entorno tridimensional de los scaffolds: composición, estructura porosa y, por supuesto, la respuesta biológica a las células implantadas y a los tejidos circundantes. Por lo tanto, el desarrollo de estos andamios plantea importantes desafíos.

Para responder a todos los requisitos necesarios, los scaffolds deben ser fabricados con polímeros con propiedades idóneas. Pero además de mostrar unas propiedades básicas y un diseño adecuado, en la selección de estos materiales se requiere un profundo conocimiento de los factores que afectan a las interacciones de las células entre tejido y andamio. Un buen resultado en ingeniería de tejidos depende también de muchos otros factores, p.e. el tipo de células a utilizar e incluso el método escogido para su cultivo. Un proceso con éxito de ingeniería de tejidos es aquel en el que tienen lugar de forma adecuada las siguientes etapas:

- 1) Elaboración de los andamios adecuados que deben conservar su arquitectura interna y la forma con la que fueron diseñados para alojar las células del tejido a regenerar.
- 2) Recolección a partir del donante del tipo de células a implantar. Estas células deben ser cultivadas hasta que estén en condiciones de ser sembradas en el andamio.
- 3) Las células deben sembrarse en el andamio. Posteriormente estas células deben adherirse, propagarse y colonizar el andamio.
- 4) El andamio y el tejido sobre él formado debe implantarse en el huésped de manera que funcionalmente forme parte de él.
- 5) El implante debe fijarse al tejido u órgano y debe “comunicarse” con él mediante las células que lo constituyen.
- 6) La herida debe iniciar su curación mostrando signos de aceptación de implante y regeneración de tejidos.

### 3.7.1. Diseño de futuros materiales

Como se indicó anteriormente, el máximo objetivo de la ingeniería de tejidos es reemplazar, mejorar o reparar las funciones biológicas de partes dañadas, ausentes o de mal funcionamiento de un tejido o un órgano. La selección de la mejor estrategia en el desarrollo de materiales híbridos para la regeneración de un tejido específico defectuoso, está determinada por varios factores, tales como: la viabilidad técnica, las propiedades requeridas del implante y la interacción del huésped con el injerto [17]. Básicamente, tres estrategias generales (esquemáticamente representadas en la Figura 3.14) se han adoptado para la creación de nuevo tejido [13]; éstos se describen a continuación.



**Figura 3.14.** Representación esquemática de la aplicación de los scaffolds en la ingeniería de tejidos [22]

#### 3.7.1.1. Auto-ensamblaje de células

Este enfoque corresponde a la directa implantación in vivo de células aisladas o sustitutivas, se basa en la síntesis de sus propias células de la matriz. Este enfoque evita las

complicaciones de la cirugía, permitiendo la sustitución de sólo aquellas células que suministren la función necesaria y la manipulación de ellas antes de la infusión.

Sus posibles limitaciones incluyen la falta de células infundidas para mantener la función del destinatario y el rechazo inmunológico [13,18]. Para otros autores [19], este enfoque implica una capa de células secretoras de su propia matriz, que a lo largo de un período de *in vitro* se convierte en un cultivo de hoja. Además, la formación de múltiples capas puede dar lugar, p.e., a la formación de sustitutos de la piel o de vasos sanguíneos. Sin embargo, se conoce que muchos tipos de células son de anclaje dependiente (su función es específica, depende de interacciones célula-sustrato), y por lo tanto su trasplante directo o *in-vitro* sin un scaffold, como se sugiere en este enfoque, da como resultado muerte celular o pérdida de la función [16,18].

#### **3.7.1.2. Matriz no celular**

Este enfoque se basa en la implantación directa *in vivo* de biomateriales [16,18] especialmente diseñados para facilitar la invasión y el crecimiento de células de tejidos contiguos. Este proceso, donde la regeneración depende del crecimiento del tejido circundante, se conoce como inducción de tejido [16]. En muchos casos, la matriz es cargada con factores de crecimiento o con algún otro compuesto químico con actividad terapéutica.

Con esta estrategia, no hay introducción de células extrañas, pero su éxito depende de la infiltración, de la adhesión y del crecimiento de las células adecuadas y así conseguir una adecuada reparación de los tejidos. Como éstas son las propias células del paciente, no es frecuente que se produzca rechazo inmunológico. Además, este tipo de matrices son fácilmente disponibles y utilizables.

#### **3.7.1.3. Scaffolds poliméricos con células sembradas**

En este apartado, se desarrollan externamente tejidos humanos que posteriormente son implantados en el organismo. El scaffold proporciona un sustrato adhesivo en el que crecen las células y un apoyo físico y mecánico para la formación y organización del nuevo tejido [13,16,18]. Las células transplantadas se adhieren al andamio, proliferan, segregan sus propias matrices extracelulares y estimulan la formación de un nuevo tejido que cuando alcanza un determinado nivel de crecimiento es implantado en la zona a regenerar. Semanas o meses después de que el andamio sea implantado, la matriz polimérica se degrada gradualmente hasta su eliminación por completo. Este es considerado por muchos como el clásico enfoque de la ingeniería de tejidos y es el más ampliamente estudiado.



A partir de la descripción genérica de los tres enfoques básicos en ingeniería tejidos, es posible concluir que la regeneración/sustitución de tejido dañado depende en gran medida de las interacciones de los tres principales componentes: la matriz polimérica, las células y los factores de crecimiento. También es obvio que nuevas estrategias más avanzadas deriven de la combinación de estos tipos.

### **3.7.2. Requisitos para un scaffold: presente y futuro**

Los requisitos para que los materiales de los scaffolds sean considerados apropiados dentro las aplicaciones de la ingeniería de tejidos, son complejos y en muchos casos no existe consenso entre la comunidad de investigadores de biomateriales y la demanda específica que se requiere para una aplicación en particular. Estos requisitos dependen principalmente del tejido a restaurar y de la ubicación y del tamaño del defecto a tratar. Sin embargo, hay algunas características claves que deben poseer los materiales de los scaffolds:

- 1) Biocompatibilidad, tanto en la forma implantada como en la degradada, es decir, los scaffolds y sus productos de degradación no deben provocar una respuesta inmune adversa o una elevada toxicidad [7,11,12,16,18].
- 2) Propiedades mecánicas adecuadas para proporcionar la correcta tensión ambiental para el nuevo tejido; esto es particularmente importante para la regeneración de tejidos duros [7,11,12].
- 3) Velocidad de degradación controlada: la velocidad de degradación del andamio debe ser regulable para que “se sincronice” con la velocidad de regeneración del tejido. Es deseable que la resistencia mecánica del andamio disminuya con el tiempo y que la función mecánica la ejerza progresivamente el nuevo tejido que se forma [7,11,12,16,18].
- 4) Morfología y tamaño de poro adecuado: la porosidad, el tamaño del poro y su estructura son factores importantes que están asociados con el suministro de nutrientes a las células transplantadas y regeneradas [12,16,18,20]. Existe un consenso general en que es necesaria una elevada relación superficie/volumen y un tamaño de poro mayor que el diámetro de una célula en suspensión acuosa (aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ). El tamaño de poro óptimo no es general y, lógicamente depende del tejido que va a ser restaurado o sustituido. En el caso de la regeneración ósea, algunos autores sostienen que se alcanza un crecimiento máximo del tejido con un tamaño de poro oscilante de 200 a 400  $\mu\text{m}$ , para otros debe ser de 100 a 150  $\mu\text{m}$  o de 100 a 350  $\mu\text{m}$  [21]. La interconexión entre los poros es muy necesaria, ya que una red estructural de poros interconectados mejora las velocidades de difusión hacia el



centro del scaffold y facilita la vascularización [12,16,18,20], así mejora el suministro de oxígeno y de nutrientes y elimina los desechos.

- 5) Superficie química adecuada para la adhesión celular, su proliferación y diferenciación: la mayoría de las células de los órganos son de anclaje dependiente, requieren la presencia de un sustrato adecuado para conservar su capacidad para proliferar y realizar funciones diferenciadas. La adhesión de la célula a la superficie del andamio es una etapa previa y fundamental para las funciones celulares, tales como la difusión, la proliferación, la migración y la actividad biosintética [11,12,16,18,20]. Por lo tanto, las características de la superficie de los materiales, como la composición química, la energía o la humedad, juegan un papel importante en la adhesión de células en los biomateriales. No siempre un biomaterial con buenas propiedades mecánicas para su uso en el ámbito médico, posee también las características superficiales óptimas para esta aplicación. Por ese motivo, en algunos casos deben realizarse modificaciones en la superficie, tales como raspado, revestimiento, mezclado e injerto.
- 6) Fácil esterilizado ya sea por exposición a altas temperaturas, vapor de óxido de etileno, o radiación gamma y el resto no se vea afectado por una de éstas técnicas.
- 7) Fácil procesado en formas tridimensionales de geometría irregular que pueda mantenerse después de la implantación [7,11,16,18]. En algunos casos, es necesaria una única geometría tridimensional para que un scaffold se adapte a un defecto irregular. El tejido regenerado, por lo tanto, se espera que tome la forma del scaffold inicial.

La ingeniería de tejidos está demandando claramente más materiales sofisticados para realizar scaffolds que puedan realizar múltiples funciones y, por lo tanto, ayudar a crear híbridos de tejidos sustitutos más rápidamente y con mejoras biológicas en el rendimiento. Por eso, en el futuro, para el diseño adecuado de materiales que realicen estas funciones será necesario abordar otros aspectos, además de éstos requisitos básicos.

Por otro lado, todavía hay limitaciones tecnológicas que se deben superar para obtener andamios con la estructura y las propiedades diseñadas. En primer lugar, los ingenieros de tejidos deberán comprender exactamente la aplicación de destino de los materiales que están diseñando y así, adaptar la regeneración del tejido al defecto específico. Para ello, es vital conocer las opciones disponibles entre los biomateriales poliméricos actuales.

### 3.7.3. Procesamiento de scaffolds

El desarrollo de matrices para servir como plantillas para la fijación/suspensión y carga de células ha progresado a gran velocidad en los últimos años. Seguidamente, se describen diversas técnicas [21] de procesamiento que han sido desarrolladas para fabricar scaffolds:

- Procesado de fibras (mallas geotextiles).
- Solvent casting & Particulate leaching.
- Superposición de láminas.
- Moldeado por fusión (melt moulding).
- Liofilización (freeze-drying).
- Métodos a alta presión (agregación de micropartículas de polímero y procesamiento de alta presión con CO<sub>2</sub> supercrítico).
- Polimerización *in-situ*.
- Tecnologías de prototipo rápido

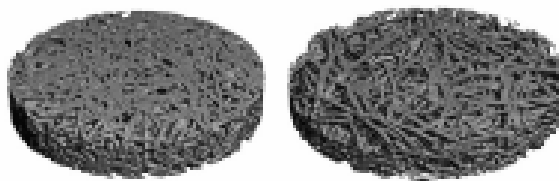
Recientemente, scaffolds en 3D altamente porosos han sido obtenidos utilizando tecnologías textiles avanzadas y tecnologías de prototipo rápido, tales como modelos de deposición fundida (FDM) e impresión en 3D (3DP). Estas tecnologías de ingeniería son altamente reproducibles y controlables y facilitan la fabricación de estructuras bien definidas en tres dimensiones. El principal problema asociado con los scaffolds producidos por los métodos desarrollados hasta ahora, es su debilidad mecánica (falta de rigidez y resistencia), que no permite su utilización en la regeneración de los tejidos duros, donde se requieren scaffolds de alta resistencia. A continuación, las técnicas son brevemente descritas:

#### 3.7.3.1. Procesado de fibras (mallas geotextiles)

Constituidas por mallas de fibras individuales tejidas en 3D y diseñadas con tamaño de poro variable. Las características ventajosas de la mallas de fibras son, por un lado, que tienen una gran superficie para la fijación de las células y por otro, una buena interconexión entre los poros que permite la rápida difusión de nutrientes con el consiguiente aumento del crecimiento y la supervivencia celular. Un inconveniente de estos andamios es la dificultad en el control de precisión de la porosidad.

Existen dos métodos diferentes [21] para la creación de las mallas de este tipo:

- 1) Un conjunto de fibras de PGA, obtenidas por extrusión, se sumergen en una solución de PLLA en solventes clorados. Cuando el disolvente se evapora, la red de fibras de PGA se incrusta en la matriz de PLLA. Seguidamente la matriz se somete a varios tratamientos térmicos con el fin de que las fibras de PGA se suelden parcialmente, formando una estructura tridimensional muy porosa. Finalmente, el PLLA se elimina por disolución con cloruro de metileno. Esta técnica da como resultado andamios con porosidades de hasta el 81% y diámetros de poro por encima de los 500 µm.



**Figura 3.15.** Tomografía microcomputerizada en 3D ( $\mu$ CT). Imagen de la malla de fibra de SPCL (mezcla de almidón con policaprolactona) con un 50% de porosidad (izquierda) y 75% (derecha).

- 2) Una disolución de PLLA o PLGA en cloroformo que se pulveriza sobre una cantidad de fibras de PGA. Seguidamente el disolvente es evaporado, dejando PLLA o PLGA adherido a las fibras. La malla final se obtiene tras un tratamiento térmico y eliminación de PLLA o PLGA por disolución. El tamaño de poro de estos andamios es similar a los del anterior método. Los andamios se implantaron en ratas durante 17 días, donde se observó el tejido fibroso en crecimiento, lo que indica que construcciones con estas propiedades físicas podrían provocar la formación de nuevo tejido.

Aunque los scaffolds así obtenidos, son adecuados para la regeneración de los tejidos, implican el uso de solventes que podrían ser tóxicos para las células si no están bien eliminados. La eliminación de estos productos químicos, implica su secado al vacío durante varias horas, lo que hace difícil la utilización inmediata del producto en una clínica. La combinación de productos químicos tóxicos y los tratamientos a extremas temperaturas dificultan la fijación superficial de moléculas bioactivas, como factores de crecimiento.

### 3.7.3.2. Evaporación de disolventes y disolución de partículas

Este método denominado también solvent casting & particulate leaching [18] consiste en dispersar partículas sólidas solubles en agua y previamente tamizadas de sales minerales (p.e., NaCl) u orgánicas (por ej. sacarosa) en una solución polimérica. Esta dispersión se procesa por fusión o bien por congelación/evaporación para producir soportes en forma de láminas o cilindros. La formación de poros tiene lugar al disolver selectivamente las partículas dispersas en la matriz. La cantidad y el tamaño de los poros pueden controlarse variando la cantidad y el tamaño de las partículas dispersadas. En cambio, la superficie depende tanto de la fracción de peso de la fase soluble inicial como del tamaño de las partículas. Una variante de este método se realiza al someter a vibración el conjunto durante la dispersión de las partículas y la evaporación del disolvente.

Las desventajas de este método son que implica el uso generalizado de disolventes orgánicos que pueden ser tóxicos y la falta de homogeneidad en láminas de un espesor

superior a 3 mm. Esta técnica ha sido validada para PLLA y PLGA pero se puede aplicar a cualquier otro polímero que sea soluble en un disolvente, como el cloroformo o el cloruro de metileno. Scaffolds producidos por este método se han utilizado en un número significativo de estudios con aplicación en la ingeniería de tejidos.

#### **3.7.3.3. Superposición de láminas**

Este método [21] utiliza membranas previamente preparadas mediante el apartado anterior. Las membranas, con la forma apropiada, son impregnadas de disolvente y luego apiladas en tres dimensiones con una morfología y una estructura de poro continua. La mayoría de las propiedades finales de los scaffolds en 3D son idénticas a las que tenía cada membrana individualmente.

Este método puede permitir la construcción tridimensional de espumas de polímero con una forma anatómica precisa, ya que es posible utilizar un modelo asistido por ordenador para diseñar plantillas con la forma del implante deseada. Sin embargo, esta técnica de fabricación se está eliminando porque sólo pueden ser utilizadas membranas delgadas. Otra desventaja es que la superposición de láminas porosas sólo puede generar un número limitado de poros interconectados.

#### **3.7.3.4. Moldeado por fusión (melt moulding)**

Esta técnica, melt moulding [21] ha sido normalmente utilizada en combinación con técnicas donde se utiliza porógeno o para producir una preforma del material final, por ejemplo, para producir fibras que se utilizarán en métodos de aglomerado de fibras, según lo descrito anteriormente, o en métodos a alta presión descritos más abajo.

Un ejemplo típico de aplicación de este método es el que se realiza cargando una mezcla de polvo fino de PLGA y microesferas de gelatina en un molde de PTFE (politetrafluoroetano; teflón) y luego calentar por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero. El compuesto PLGA-gelatina es posteriormente retirado del molde y las microesferas de gelatina se eliminan disolviéndose en agua. De esta manera, se pueden producir andamios porosos de PLGA con geometría idéntica a la del molde, en consecuencia, se pueden conseguir scaffolds de formas diversas, siempre que dispongamos del molde correspondiente.

Este método ofrece también un control independiente de porosidad y tamaño de poro si se varía la cantidad y el tamaño de las microesferas utilizadas, respectivamente. Además, es posible incorporar moléculas bioactivas, ya que este proceso no utiliza disolventes orgánicos y se lleva a cabo a temperaturas relativamente bajas. Otros componentes lixiviables pueden ser utilizados además de la gelatina. Esta técnica de fabricación, también podrá aplicarse a

PLLA, PGA o PADAS. Sin embargo, son necesarias temperaturas más altas (por encima de las temperaturas de fusión del polímero) porque estos polímeros son semicristalinos, y esto excluye la posibilidad de incorporar proteínas en estos sistemas.

### **3.7.3.5. Liofilización (Freeze-drying)**

El principio básico del freeze-drying [21] es la separación de fases inducida térmicamente, que se produce al disminuir la temperatura de una solución homogénea de un polímero dispuesto en un molde. Una vez que el sistema se estabiliza, la fase rica en disolvente se elimina por sublimación al vacío, dejando atrás la espuma polimérica. La morfología de la espuma es controlada por cualquier transición de fase que ocurra durante la etapa de enfriamiento, es decir, separación líquido-líquido o sólido-líquido. Investigaciones actuales demuestran que este método es muy sensible, por lo tanto, los parámetros deben estar muy bien controlados. En la actualidad, sólo se pueden obtener tamaños de poro de alrededor de 100  $\mu\text{m}$ .

### **3.7.3.6. Agregación de micropartículas de polímero**

Este método [21] consiste en la agregación, por medios físicos o químicos, de micropartículas de polímero. La porosidad se crea entre las microesferas agregadas y el tamaño del poro va directamente relacionado al diámetro de la microesfera. La posibilidad de liberar factores de crecimiento con anterioridad al encapsulado de las microesferas es una ventaja adicional de esta técnica.

### **3.7.3.7. Procesamiento de alta presión con CO<sub>2</sub> supercrítico**

En esta técnica [21], discos sólidos de polímero, previamente preparados por moldeo a compresión o por solvent casting, son expuestos a CO<sub>2</sub> de alta presión (5,5 MPa, 25°C) para saturar el polímero con el gas. Debido a la reducción de la presión del gas CO<sub>2</sub> hasta valores ambientales, se crea una despresurización donde la expansión del CO<sub>2</sub> disuelto en el polímero genera una estructura porosa.

Este proceso da lugar a una estructura con la superficie no porosa, como resultado de la rápida difusión del gas disuelto en la superficie y una estructura de poro cerrado en la parte interior de la matriz polimérica, que puede ser problemático para la siembra celular. La porosidad y la estructura del poro dependen de la cantidad de CO<sub>2</sub> disuelto, de la velocidad, del tipo de nucleación del gas y de la velocidad de difusión del gas a los núcleos del poro. Este proceso ha sido utilizado para obtener espumas de PLGA con 93% de porosidad y un tamaño de poro alrededor de los 100  $\mu\text{m}$ .

### **3.7.3.8. Polimerización *in-situ***

Los métodos anteriores implican la utilización de polímeros previamente fabricados. La técnica de polimerización *in-situ* [21], utiliza hidrogeles poliméricos mezclados con células que pueden introducirse en el organismo mediante inyección. Durante la inyección, el hidrogel puede entrecruzarse para formar in situ una matriz tridimensional. Este sistema es ideal para rellenar cavidades óseas, puesto que el hidrogel semilíquido puede acceder a zonas con geometría complicada y con accesibilidad limitada. Además también es posible la incorporación de NaCl para proporcionar poros dentro de los cuales se puede crecer nuevo tejido. Mediante este procedimiento, se forma un andamio temporal in situ, cumpliendo el papel necesario para la regeneración del tejido dañado.

La introducción del scaffold mediante inyección permite una aplicación localizada mediante la que podemos introducir las células y su andamio en una zona muy concreta. Además, gracias a esta característica diferenciada conseguimos que la carga de la construcción sea menos invasiva y que se disminuyan los riesgos quirúrgicos. La utilización de hidrogeles puede permitir incluso la carga y distribución de un número de células preciso. Los hidrogeles pueden ser fabricados para proporcionar apoyo mecánico inmediato a las células y así mantener su fenotipo específico, sin inhibir la migración.

El uso de hidrogeles puede representar un importante paso hacia la cirugía invasiva minimalista. Sin embargo, la mayoría de las reacciones de polimerización son exotérmicas y por lo tanto, el calor generado puede causar la disfunción del tejido local.

### **3.7.3.9. Tecnologías de prototipo rápido**

Las tecnologías de prototipo rápido (RP) [21] tienen el potencial de producir construcciones tridimensionales de geometrías complejas, con un diseño multicapa dentro de la misma estructura arquitectónica gruesa y desde un modelo de un objeto diseñado por ordenador (CAD), sin un conocimiento ni unas herramientas específicas. Estas tecnologías, como las de impresión en 3D (3DP) o el moldeo por deposición fusionada (FDM), son procesos de fabricación capaces de crear andamios porosos que imiten la microestructura de los tejidos vivos.

### **3.7.4. Origen de las células.**

Las células a utilizar en ingeniería de tejidos pueden ser aisladas de diversas fuentes, pero para que el rechazo inmunológico sea mínimo es preciso limitarse a tres únicas posibilidades.

#### **3.7.4.1. Células de otros individuos (alogénicas)**

Son células obtenidas generalmente a partir del organismo de un donante de la misma especie. Sin embargo, en muchas experiencias de implantes cardiovasculares en humanos, se han utilizado células obtenidas de animales, puesto que hasta hace pocos años el empleo de células humanas para experimentos in vitro generaban problemas éticos y religiosos.

Los fibroblastos de la piel alogénicos no crean excesivos problemas inmunológicos y son utilizados habitualmente para implantes cutáneos de la piel. En cambio, se comportan de manera peor que los fibroblastos de vasos cuando son empleados en implantes vasculares. Además de los fibroblastos, las células endoteliales del cordón umbilical son una fuente de células a utilizar en implantes en arterias.

#### **3.7.4.2. Células del propio individuo (autogénicas)**

Los tratamientos terapéuticos en los que se emplean las propias células del paciente son los más adecuados desde el punto de vista inmunológico y, en la actualidad se tienden a utilizar esta metodología. No obstante hay casos en los que esto no es factible.

Un implante autogénico implica dos intervenciones realizadas en el plazo de aproximadamente una semana, en la primera se realiza la extracción de una cierta cantidad de células y en la segunda éstas células se implantan. En algunos casos es el cirujano que no quiere dos intervenciones, o es el propio hospital por los gastos de quirófano e internamiento que se generan. Un autoimplante requiere dos lugares a intervenir quirúrgicamente (recolección e implante de células), con el consiguiente aumento de dolor y riesgo de infección para el paciente. Por último indicar que algunos enfermos de edad avanzada no disponen de suficientes células viables.

En consecuencia, existe un interés creciente por metodologías alternativas que no presentan estos inconvenientes y que implican el cultivo de células y el estiramiento de los tejidos. Los tejidos fetales o los existentes en el cordón umbilical son muy útiles para estos propósitos pues son no inmunogénicos y son ricos en células madre. No obstante, su empleo aún sigue generando problemas éticos en algunos lugares.

#### **3.7.4.3. Células madres**

Las células denominadas células madres son células con capacidad de diferenciarse en algún tipo celular siempre que sea inducida (por moléculas señal) adecuadamente. Existen diferentes tipos de células madres que pueden ser clasificadas en función de su capacidad de diferenciación. Las células madres obtenidas de la masa celular interna del blastocisto (embrión preimplantacional de 5 días de desarrollo en mamíferos), son consideradas como



células totipotentes porque pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula (fibroblasto, epitelial, neuronal, etc.). Las células madres obtenidas de cordón umbilical pueden ser consideradas pluripotentes, esto significa que han perdido algo de capacidad para diferenciarse en ciertos tipos celulares. También es posible la obtención de células madres de tejidos de organismos adultos, por ejemplo, se han obtenido a partir de tejido graso, estas células son llamadas células madres somáticas, y su capacidad de diferenciación es mucho menor cuando se las compara con las células madres pluripotentes.

### 3.8. Electrospinning

El *Electrospinning* o *Electrohilado* es una técnica que utiliza fuerzas eléctricas para producir fibras, de una forma relativamente simple y poco costosa, con diámetros que varían desde unos pocos nanómetros hasta algunos micrómetros [23,24].

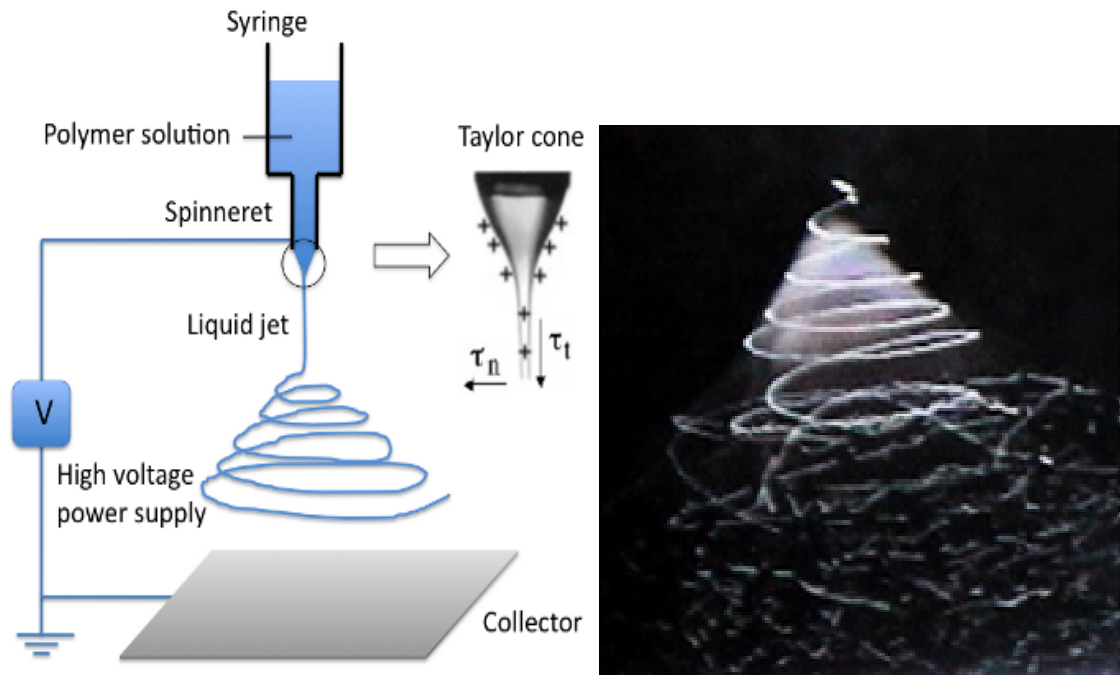
Esta técnica se conoce desde hace más de 60 años en la industria textil y se utilizaba para la fabricación de telas no tejidas de fibra. En los últimos años ha habido un creciente interés por esta tecnología, que permite producir fibras a micro y nano escala. En *Biomedicina* las microfibras obtenidas son utilizadas para la fabricación de andamios temporales en ingeniería de tejidos.

#### 3.8.1. Principios de la técnica

El primer fenómeno de interacción de líquidos con campos eléctricos y magnéticos fue descrito por Guillermo Gilbert ya en 1628. Sólo después de mediados de 1900, Geoffrey Ingram Taylor produjo la primera discusión teórica de la interacción de una gota de fluido con el campo eléctrico. No fue hasta principios de los años 90 cuando se empezó a hablar acerca del término spinning electrostático, anunciado por Reneker, y desde esa fecha el número de publicaciones y estudios fue aumentando progresivamente, extendiéndose primero desde su impulsor, EEUU, hasta nuevos pioneros como Alemania o Corea. En estos últimos 20 años, pero más significativamente durante la última década, se han dedicado un número importante de esfuerzos al desarrollo y mejora de esta técnica, cuyo nombre actual, *electrospinning*, fue cuñado alrededor de 1994. Aun así, la patente por el *electrospinning* se registró en el 1934 por Formhals y ésta describía un dispositivo experimental para la producción de filamentos de polímero empleando un campo electrostático [25]. El crecimiento del uso de esta técnica podría atribuirse al interés actual en las microfibras y nanofibras. El *electrospinning* inicialmente solía producir fibras muy finas de materiales poliméricos para obtener matrices con alta superficie. Actualmente, la técnica se orienta a la fabricación de micro/nanofibras con multitud de aplicaciones, desde la cosmética, ensayos ópticos, textiles, hasta la investigación médica, entre otras [26-28].



La técnica del *Electrospinning* consiste en aplicar un campo electrostático elevado entre dos polos, conformados por una aguja de un sistema de inyección y una placa metálica o colector (el cual está a potencial 0) donde se depositan las fibras nano o micrométricas formando un tejido o matriz porosa (llamada *electrospun* o *mat*) con textura, color, y densidad características [24,28-30].



**Figura 3.16.** Diagrama de un equipo de electrospinning y foto estereográfica del Cono de Taylor

La Figura 3.16 muestra un esquema típico de un equipo de *electrospinning*. En la parte superior suele disponerse una jeringa de inyecciones a la que llega la disolución del polímero, previamente preparada, mediante un tubo de plástico inerte. Una bomba de infusión o perfusión unida al émbolo de la jeringuilla genera una presión y un flujo constante que, a través del tubo, se trasmite a la disolución del polímero en la aguja. Por el efecto de la polarización y la carga originadas por el campo eléctrico, la solución es atraída en forma de chorro hacia la superficie conductora, dispuesta a cierta distancia, conectada a tierra. Durante el recorrido aguja-placa colectora, el solvente se evapora gradualmente y el producto obtenido se deposita en forma de micro o nanofibras no tejidas distribuidas al azar.

En el flujo electro-hidrodinámico del *jet*, las cargas son inducidas en el fluido a través de la distancia de separación de los electrodos (punta de la aguja y colector metálico), rompiéndose la tensión superficial a través del campo eléctrico y descomponiéndose en una fuerza tangencial ( $t$ ) y una normal ( $n$ ), formando el denominado *Cono de Taylor* (Figura 3.16) [26,28-31]. La gota líquida se mantiene sujeta al extremo de la aguja por su tensión

superficial hasta que la repulsión mutua entre las cargas del mismo signo, que se originan en la superficie de la gota, es suficientemente elevada para contrarrestar la fuerza de contracción anteriormente indicada. La superficie de la gota sufre progresivamente el efecto de esta fuerza resultante y empieza a alargarse y a formar un cono inverso, llamado *Cono de Taylor*. El proceso de elongación llega a un límite en el que la concentración de la carga eléctrica sobrepasa en gran medida a la tensión superficial y da lugar, en la punta del cono, a un haz que recorre diferentes trayectorias inestables, observándose un alargamiento, una reducción del diámetro y una evaporación del disolvente, originándose así una fibra sólida [26,30,31].

A medida que el *jet* adquiere una aceleración significativa, su diámetro disminuye en magnitud. Finalmente, el *jet* solidifica convirtiéndose en una fibra de medidas micro/nanométricas. En la operación se mantiene una corriente continua con alto voltaje con una intensidad muy reducida, del orden de microamperios. En este método no siempre es posible obtener resultados positivos ya que, en ocasiones, según la naturaleza del disolvente empleado para la realización del polímero, la concentración de éste o las variables del equipo de *electrospinning*, podemos observar que el polímero no se transforma en nanofibra, simplemente se queda como polímero (en forma de gotas) o fibras mezcladas con gotas (*electrospraying*).

### 3.8.2. Parámetros de proceso

El control de la técnica del *electrospinning* es aparentemente sencillo, pero el proceso se complica al existir varios parámetros que influyen simultáneamente sobre las propiedades de las fibras que se obtienen. Estos parámetros se pueden clasificar en tres grupos [32-34].

- 1) *Propiedades de la disolución*: tipo de polímero empleado, peso molecular de éste, estructura del polímero (lineal, ramificado, etc.), concentración, viscosidad, conductividad y densidad de carga en la superficie, tensión superficial y constante dieléctrica del solvente.
- 2) *Variables del equipo*: velocidad de flujo, potencial eléctrico, distancia entre la punta de la aguja y el colector, geometría y tipo de colector.
- 3) *Parámetros ambientales*: humedad, temperatura de la disolución y velocidad del aire en la cámara de *electrospinning*.

En la Tabla 3.6 se muestra de forma esquemática la influencia de algunos de estos parámetros en las características de las fibras preparadas. No obstante, hay que tener en cuenta que la interrelación de unos con otros complica el proceso y que siempre es

necesaria la realización de múltiples ensayos experimentales que conduzcan a encontrar las condiciones idóneas para el experimento [24,27].

Una vez en funcionamiento el proceso de *electrospinning* se ha de tener en cuenta tres aspectos muy importantes de las fibras obtenidas [24].

- 1) Los diámetros de las fibras, que sean representativas y controlables.
- 2) La superficie de las fibras, que no presente defectos como por ejemplo la formación de gotas.
- 3) Intentar conseguir nanofibras aisladas, es decir, que no se produzcan aglomeraciones que dificultan el estudio y uso de las fibras preparadas.

### 3.8.3. Aplicaciones generales

Existen múltiples y recientes aplicaciones de las fibras de *electrospinning* en diversos campos científicos. A continuación se resumen algunas aplicaciones generales más destacadas, esquematizadas en la Figura 3.17 [26].

- 1) *Composites*: una aplicación importante de las fibras obtenidas mediante *electrospinning* es su uso como refuerzos con el objetivo de mejorar las prestaciones mecánicas, de tal modo que los materiales permitan ser sometidos a mayor carga, tensión o deformación mecánica y reducir el peso substituyendo un material determinado por *composites* [30].

Hasta el momento, los esfuerzos en el campo de los *composites* con fibras para *electrospinning* se han dirigido a desarrollar las propiedades físicas (ópticas y eléctricas) y químicas, y a mantener las prestaciones mecánicas en niveles correctos [30].

Esta aplicación del método también presenta ciertas limitaciones. Una de ellas es en el campo del refuerzo, ya que aún no se han obtenido fibras continuas y uniaxiales que puedan dar una mayor resistencia al material. Otro problema importante en este campo se debe a que los polímeros que mejor funcionan en el momento de dar fibras no siempre son los más indicados para los refuerzos estructurales de materiales.

**Tabla 3.6.** Efectos de los distintos parámetros del electrospinning en la morfología de las electrofibras.

Parámetro de proceso	Efectos sobre la morfología de las fibras
<b>Viscosidad/ Concentración</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estos dos parámetros son directamente proporcionales.</li> <li>Existe un mínimo de concentración para cada disolución. A partir de este valor se obtendrán fibras sin aglomerados y a medida que se aumenta la concentración de las fibras, aumentarán de diámetro. De la misma forma existirá un máximo de concentración.</li> <li>Con bajas viscosidades se obtienen fibras discontinuas y con altas viscosidades se dificulta la movilidad de la disolución en el equipo. Por lo tanto se requiere una viscosidad óptima para cada proceso de <i>electrospinning</i>.</li> </ul>
<b>Conductividad/ Densidad de carga en la superficie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Un aumento de la conductividad ayuda a obtener fibras uniformes y sin defectos.</li> <li>En general, altas conductividades implican diámetros de fibra pequeños.</li> </ul>
<b>Tensión superficial</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Generalmente, al disminuir esta propiedad se reduce la presencia de agregados. Si es elevada, crea inestabilidad en la generación del haz y se producen gotas.</li> </ul>
<b>Peso molecular</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>El incremento del peso molecular disminuye el número de gotas y aglomeraciones. Se suelen electrohilar polímeros de alto peso molecular por esta razón.</li> </ul>
<b>Momento dipolar/ Constante dieléctrica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La experiencia dice que si la constante dieléctrica del solvente es alta, mejores resultados se obtienen con la técnica de <i>electrospinning</i>.</li> </ul>
<b>Velocidad de flujo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cuando las fibras son de diámetros pequeños, la velocidad de flujo ha de ser también pequeña.</li> <li>A elevado flujo, al solvente no le da tiempo a evaporarse.</li> <li>Normalmente se opera con flujos entre 0,5 y 10 mL/h.</li> </ul>
<b>Potencial eléctrico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A medida que el campo eléctrico es más intenso se obtienen generalmente fibras de menor tamaño.</li> <li>Se requiere de una diferencia de potencial entre 0 a <math>\pm 50</math> kV para electrohilar.</li> </ul>
<b>Distancia aguja-colector</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se requiere una mínima distancia para que se formen fibras.</li> <li>A distancias muy cortas o demasiado largas se producen aglomeraciones y gotas.</li> <li>La distancia está comprendida entre 5 y 30 cm.</li> </ul>
<b>Tipo colector</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Si es móvil, el resultado de las fibras dependerá también de la velocidad de giro de éste.</li> </ul>
<b>Parámetros ambientales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>El aumento de temperatura causa una disminución en la viscosidad de la disolución, resultando fibras de diámetro más pequeño.</li> <li>La reacción temprana de las soluciones y retraso de la evaporación de los solventes puede producir goteo y aglomeraciones en las fibras. Un porcentaje óptimo de humedad relativa estaría entre el 10 y el 40%.</li> </ul>

- 2) *La filtración*: es un proceso muy común en muchos sectores industriales y normalmente se utilizan materiales fibrosos para optimizar su uso. La finura de las fibras juega un papel importante en la eficiencia de la filtración. Las películas producidas a partir de fibras preparadas por *electrospinning* pueden ser una solución en los casos en que hay que separar micropartículas. De esta forma, se mejoraría la filtración atrapando las partículas más pequeñas en los filtros constituidos por nanofibras [30].

La limitación que se encuentra en este método recae en que algunas fibras pueden llegar a ser modificadas estructuralmente por el fluido que se está filtrando. Esta carencia podría ser salvada por un previo acondicionamiento de la fibra, en el cual ya se está trabajando.

- 3) *Tecnología textil*: el campo de la industria textil es un ámbito en el cual se lleva investigando a lo largo de la historia. La aplicación de fibras de *electrospinning* en este ámbito también ha sido llevada a cabo con éxito.

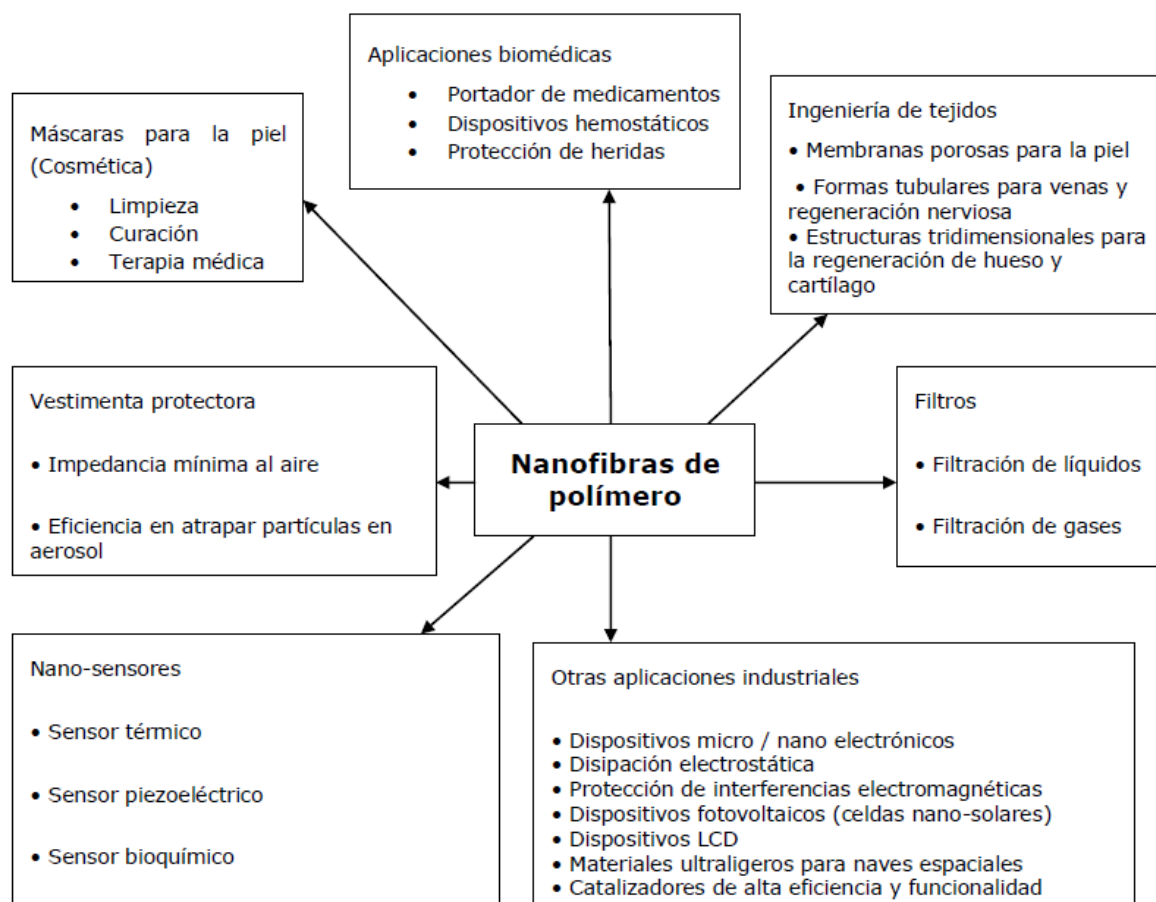
Los tejidos de nanofibras son capaces de neutralizar agentes químicos sin dejar de ser permeables al aire y al vapor debido a su gran superficie. El *electrospinning* produce capas de nanofibras que presentan una alta porosidad, pero tamaños de poros muy pequeños. Por esto, este tipo de tejidos serían buenos candidatos en vestimentas protectoras [30].

- 4) *Cosméticos*: otra de las posibles aplicaciones de las fibras de *electrospinning* es en el campo de la cosmética. En este amplio campo se está investigando en máscaras adaptables a la piel. Se ha estudiado la elasticidad y facilidad de deformación de algunas fibras, gracias a estas características la aplicación de máscaras sobre la piel podría ser posible. Una segunda aplicación serían los apósitos para retirar o aplicar el maquillaje ya que, debido a la porosidad de la fibra, se pueden retener los pigmentos.

Por la versatilidad de las fibras de *electrospinning*, todos estos tratamientos pueden actuar con o sin aditivos de forma que las variaciones con una misma aplicación pueden ser múltiples.

Algunas de las aplicaciones en las que se está investigando son éstas, pero hay que decir que es muy difícil delimitar un campo de aplicación en este sector, ya que el mercado de la cosmética está en constante evolución [35].

- 5) *Aplicaciones ópticas y eléctricas*: la tecnología es otro de los campos en los que la técnica de *electrospinning* se abre camino. Actualmente se están intentando producir pequeños dispositivos electrónicos y baterías de alto rendimiento (con electrodos porosos) a partir de nanofibras que provienen de polímeros conductores. El principio de estas baterías es que la velocidad de reacción electroquímica es función de la superficie del electrodo. Este tipo de membranas también pueden ser útiles para aplicaciones en las que sea necesaria la disipación electrostática, la protección de la corrosión, el aislamiento electromagnético, etc [24,35].



**Figura 3.17.** Diversas aplicaciones de la técnica de electrospinning.

### 3.8.4. Aplicaciones biomédicas

El campo de la medicina es en el que más se está estudiando potenciales aplicaciones de las fibras de *electrospinning*. El motivo es que la mayoría de los tejidos y órganos humanos como los huesos, el colágeno, el cartílago o la piel están estructurados jerárquicamente en redes nanofibrosas.

En biomedicina es donde mayor salida y utilidad está teniendo la técnica de *electrospinning*. A continuación se muestran diferentes aplicaciones [36].

- 1) *Prótesis médicas*: es la aplicación donde más cabida se ha estudiado el empleo de micro/nanofibras obtenidas por *electrospinning*, ya que las fibras se pueden utilizar para la fabricación de un gran número de prótesis de tejido blando. Ya hay varias patentes en los EEUU para aplicaciones como venas, vascular, mama, etc. Adicionalmente, las fibras para *electrospinning* se pueden usar como films que recubran las prótesis de tejido rígido que actúan como interfaz para evitar o prevenir que la prótesis falle [37-39].
- 2) *Soportes para el crecimiento del tejido humano*: otro campo con posibilidades de futuras aplicaciones es el de los biomateriales, donde se diseñan refuerzos óptimos que sean capaces de imitar las estructuras y funciones biológicas de la matriz extracelular. Generalmente, las células humanas se adhieren mejor en cuando los diámetros de las fibras son menores que el de éstas. Por tanto, es necesario desarrollar estructuras fibrosas para la adhesión y la proliferación de las células [40]. A lo largo de los últimos años se ha dedicado una mayor investigación para generar refuerzos a partir de polímeros sintéticos biocompatibles y/o biodegradables [41].
- 3) *Protección de heridas*: las heridas o quemaduras en la piel se pueden tratar con capas poliméricas de nanofibras. El recubrimiento de las heridas con capas se podría aplicar directamente creando un campo eléctrico local. De esta manera se impulsa el crecimiento de la piel y se evita la formación de cicatrices. Una de las limitaciones de este método recae en que, como es lógico, el hueso y la piel no pueden ser tratados con el mismo tipo de fibra, ya que según su procedencia polimérica, en unos casos será efectiva y en otros no. La investigación en este campo evoluciona con rapidez y se espera que pronto forme parte de una nueva técnica médica consolidada [42,43].
- 4) *Administración de medicamentos*: cuando se suministran fármacos a los seres vivos, éstos se distribuyen en el organismo según sus propiedades físicas, tales como la solubilidad, coeficiente de partición y carga. En consecuencia, los fármacos pueden alcanzar gran variedad de tejidos y órganos, tanto los que necesitan el fármaco como los que no. Además, en muchos de ellos, puede que se encuentren fuera de su intervalo terapéutico, que sean inactivos, o que su acción sea indeseada o nociva y por tanto, con efectos secundarios negativos [44,45]. Actualmente, la administración de fármacos se realiza asociándolos a otras sustancias que mejoran su funcionamiento. En la mayoría de las modernas formulaciones de fármacos se incluyen sustancias de naturaleza polimérica. Existen dos métodos generales para optimizar la acción de los fármacos:



- *Liberación controlada*: que trata de eliminar o reducir los efectos secundarios produciendo una concentración terapéutica del fármaco que sea óptima para el organismo. En la mayoría de ocasiones se trata de aproximarse a una cinética de liberación de orden cero en la que no se produzcan cambios en la concentración del fármaco en el organismo.
- *Liberación dirigida*: que trata de llevar el fármaco hacia lugares específicos, asegurando que el fármaco es liberado en el lugar requerido y al mismo tiempo mantiene el fármaco inactivo en cualquier otro lugar del organismo.

La administración de medicamentos se puede diseñar para que existan diferentes tipos de respuesta. Por ejemplo, se puede predeterminar la velocidad de administración, el momento de activación, si se quiere una administración constante o bien por impulsos, etc. Normalmente, el cuerpo humano absorbe mejor los medicamentos si éstos son pequeños y si la capa de recubrimiento es fina. El criterio que rige la administración de medicamentos es que cuanto mayor sea la superficie del medicamento y de la estructura que lo soporte, mayor será la velocidad de disolución.

La administración de medicamentos, en cuya formulación se empleen nanofibras se puede enfocar desde diferentes puntos de vista:

- Las partículas de medicamento se incorporan a la superficie de las nanofibras que sirven de matriz.
- Tanto el medicamento como la matriz se encuentran en forma de nanofibras y el producto resultante está formado por los dos tipos de fibras entrelazadas.
- La mezcla del medicamento y del soporte en un solo tipo de fibras que contiene los dos componentes.
- La matriz se dispone por medio de *electrospinning* en formas tubulares y las partículas del medicamento se encapsulan en su interior <sup>[40]</sup>.

Es importante destacar que estamos ante una investigación que aún se halla en su primera etapa de desarrollo. Es poco el conocimiento de este tipo de métodos y si finalmente da buen resultado, no se hará efectiva hasta dentro de algunos años su aplicación en pacientes.



## 4. Objetivos del proyecto

### 4.1. Objetivo General

El objetivo general del PFC fue preparar matrices de micro/nanofibras a partir de nuevos polímeros biodegradables, tales como, la poliesteramida derivada del ácido glicólico y aminohexanoico, y de los poliésteres alifáticos derivados de monómeros con un número impar de grupos metileno. Para alcanzar este objetivo los polímeros fueron procesados mediante el electrospinning y las matrices evaluadas como potencial material biomédico.

### 4.2. Objetivos específicos

Para lograr el objetivo general propuesto en este PFC, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- 1) Sintetizar poliésteres alifáticos (PE) con un número impar de grupos metileno, derivados del 1,9-nonanediol y de los ácidos azelaico y pimélico (PE(9,9) y PE(9,7)). La síntesis se realizara mediante policondensación térmica. Los PE resultantes se caracterizarán por contener distintas proporciones del ácido azelaico y pimélico.
- 2) Sintetizar la poliesteramida (PEA) poli(glicol aminohexanoico) o poli(GLC-AMH) con estructura derivada del ácido glicólico (GLC) y del ácido cloroacetil-6-aminohexanoico (AMH). La preparación se realizará mediante policondensación en solución de tipo interfacial.
- 3) Caracterizar los polímeros sintetizados (PEs y PEA) para determinar sus propiedades físico-químicas (p.e., mediante FTIR y RMN) y las térmicas (p.e. mediante la calorimetría diferencial de barrido, DSC).
- 4) Preparar micro/nanofibras de PEs (homopolímeros y en mezclas de copoliésteres), y de poli(GLC-AMH) mediante la técnica de electrospinning. Esto implica optimizar el proceso seleccionando las condiciones de las disoluciones de los polímeros (p.e., concentración de polímero y disolventes), y los parámetros operacionales del electrospinning (p.e., distancia aguja-colector, flujo de inyección de la disolución del polímero, voltaje para generar el campo electrostático, etc.).
- 5) Caracterizar las electrofibras obtenidas durante el electrospinning. Se estudiara su morfología y diámetro por microscopia electrónica de barrido (SEM).

- 6) Establecer la potencial aplicación de las matrices de micro/nanofibras de los nuevos PE alifáticos y del poli(GLC-AMH) como plataformas (scaffold o andamio temporal) para el crecimiento celular. Para esto se utilizará el sistema de cultivo *in-vitro* de líneas celulares.

### 4.3. Alcance del proyecto

Este Proyecto tiene como alcance involucrar diferentes aspectos relacionados con la procesabilidad mediante electrospinning para conseguir matrices de micro/nanofibras de poliésteres, copoliésteres, y poliesteramida (poli(GLC-AMH)). Así, el estudio de los poliésteres alifáticos y el poli(GLC-AMH) se puede dividir en tres etapas:

- 1) Etapa de síntesis para obtener los poliésteres alifáticos, copoliésteres, y poli(GLC-AMH) mediante un proceso de policondensación, derivados de 1,9-nonanediol y los ácidos azelaico y pimélico. El conjunto de copoliésteres preparado contiene copolímeros que incorporan distintas proporciones de las dos unidades carboxílicas. Así es posible evaluar la influencia de la composición en las propiedades y la cristalinidad de estos materiales. También, la poliesteramida (poli(GLC-AMH)).
- 2) Etapa de búsqueda de las mejores condiciones de electrospinning de las muestras de poliésteres y poliesteramida mediante la elaboración de nanofibras, de manera que permita caracterizar las mejores condiciones para cada producto.
- 3) Finalmente la aplicación de las matrices elaboradas para el estudio de biocompatibilidad celular. Para ello, se comparan las diversas matrices de los nuevos polímeros sembradas con células y las matrices de polímeros comerciales (control) de manera que sea posible valorar la biocompatibilidad de estos nuevos materiales.

## 5. Metodología

### 5.1. Reactivos y solventes

A continuación se describen los reactivos utilizados en las síntesis tanto de los poliésteres como de la poliesteramida, como los utilizados a posterior de las síntesis para la evaluación de los productos en las pruebas de ensayos y para la realización de las fibras por electrohilado.

- Síntesis de los Poliésteres (PE):

1,9-nonanodiol del 99%

ácido pimélico

ácido azelaico

- Síntesis de la Poliesteramida (PEA):

6-Aminohexanoico (aminoácido)

Ácido glicólico

Éter dietílico

Hidróxido de sodio

N<sub>2</sub>

HCl concentrado (37%)

### 5.2. Equipos y fundamentos de las técnicas experimentales

En función de los parámetros y los productos intermedios y finales obtenidos que se quieren analizar existe a nuestro alcance diversas técnicas o metodologías de análisis. A continuación se describen los equipos utilizados en la parte experimental incluyendo una breve explicación de los fundamentos teóricos de las técnicas.

### 5.2.1. Espectrofotómetro de Infrarrojo (IR)

El espectrofotómetro utilizado fue un Jasco FT-IR 4100 provisto de un accesorio ATR Specac con el que los espectros se adquieren sin preparación previa de las muestras en modo de pastillas. Los espectros FTIR fueron registrados en el rango de  $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ .

Un espectro electromagnético abarca un intervalo de radiaciones que van desde las microondas hasta la radiación gamma. La zona de radiación infrarroja comprende las radiaciones con longitudes de onda desde  $0,5\text{ }\mu\text{m}$  hasta  $1\text{ mm}$ , pero en el análisis de compuestos orgánicos se analiza la zona conocida con el nombre de infrarrojo medio, es decir, la región entre  $2\text{ y }20\text{ }\mu\text{m}$ .



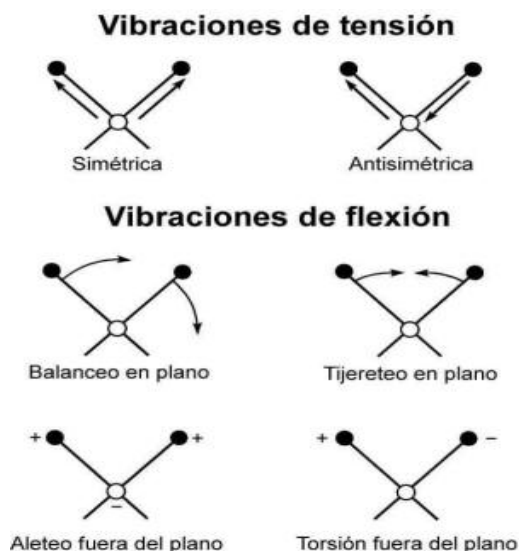
**Figura 5.1.** Espectrofotómetro Jasco FT-IR 4100

#### 5.2.1.1. Técnica experimental del FTIR

La espectroscopia infrarroja se basa en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las cuales rotan y vibran, es decir, los movimientos de rotación y vibración moleculares tienen niveles de energía discretos (modos normales vibracionales). Las frecuencias resonantes o frecuencias vibracionales son determinados por la forma de las superficies de energía potencial molecular, las masas de los átomos y, eventualmente por el acoplamiento vibrónico asociado. Para que un modo vibracional en una molécula sea activo al IR, debe estar asociada con cambios en el dipolo permanente. Sin embargo, las frecuencias resonantes pueden estar en una primera aproximación relacionadas con la fuerza del enlace, y la masa de los átomos a cada lado del mismo. Así, la frecuencia de las vibraciones puede ser asociada con un tipo particular de enlace.

Las moléculas diatómicas simples tienen solamente un enlace, el cual se puede estirar. Moléculas más complejas pueden tener muchos enlaces, y las vibraciones pueden ser conjugadas, llevando a absorciones en el infrarrojo a frecuencias características que pueden relacionarse a grupos químicos. Los átomos en un grupo  $\text{-CH}_2$ , encontrado comúnmente

en compuestos orgánicos pueden vibrar de seis formas distintas, estiramientos simétricos y asimétricos, flexiones simétricas y asimétricas en el plano (scissoring o tijereteo y rocking o balanceo, respectivamente), y flexiones simétricas y asimétricas fuera del plano (wagging o aleteo y twisting o torsión, respectivamente); como se muestra a continuación, ver Figura 5.2.

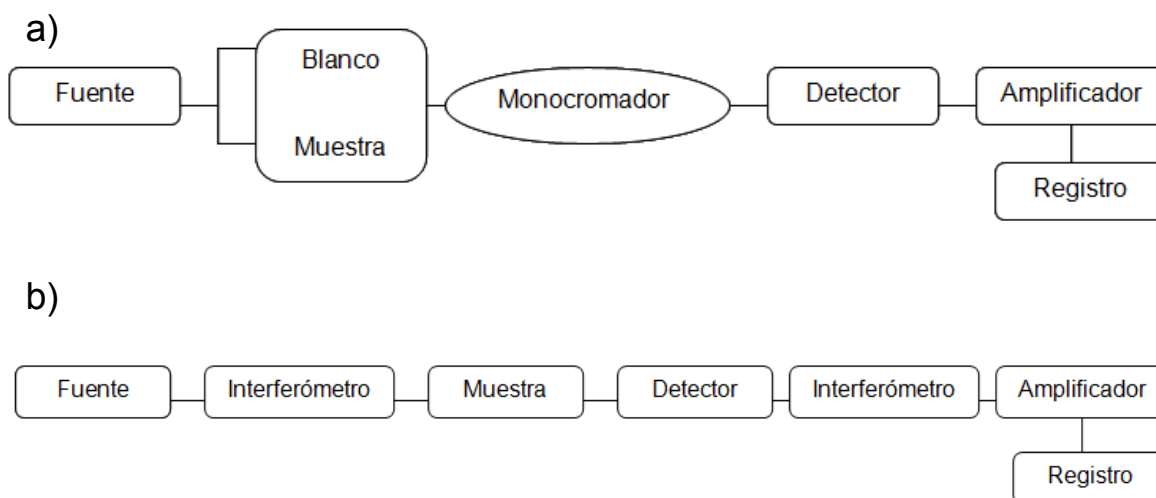


**Figura 5.2.** Modos vibracionales del grupo  $\text{-CH}_2$ .

Para medir una muestra, un rayo de luz infrarroja atraviesa la muestra. Cuando la frecuencia de excitación de un enlace (o grupo de enlaces) coincide con alguna de las frecuencias incluidas en las ondas componentes del rayo, se produce absorción. Lo que se va a registrar es la cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda. Esto puede lograrse escaneando el espectro con un rayo monocromático, el cual cambia de longitud de onda a través del tiempo, o usando una transformada de Fourier para medir todas las longitudes de onda a la vez. A partir de esto, se puede trazar un espectro de transmitancia o absorbancia, el cual muestra a cuáles longitudes de onda la muestra absorbe el IR, y permite una interpretación de qué enlaces están presentes.

Por lo tanto, el espectro IR de un compuesto no es más que una representación gráfica de la absorción que tiene lugar en la región infrarroja del espectro en función de la frecuencia de la radiación. Para poder cuantificar la cantidad de radiación absorbida se determina el porcentaje de transmitancia ( $T\%$ ). La identificación de los grupos funcionales se realiza basándose en que cada uno de ellos tiene una absorción característica para una longitud de onda determinada.

Respecto a los tipos de espectrofotómetros que existen se clasifican en dos grupos: los de barrido de doble haz y los de transformada de Fourier (FTIR) cuyos esquemas pueden observarse, respectivamente en las Figura 5.3a y b, respectivamente.



**Figura 5.3.** a) Esquema de un espectrofotómetro IR de barrido de doble haz. b) Esquema del espectrofotómetro IR de transformada de Fourier.

Esta técnica funciona exclusivamente con enlaces covalentes, y como tal es de gran utilidad en química orgánica. Espectros nítidos se obtienen de muestras con pocos enlaces activos al IR y altos niveles de pureza. Estructuras moleculares más complejas llevan a más bandas de absorción y a un espectro más complejo.

El IR de barrido de doble haz analiza las distintas longitudes de ondas absorbidas comparándolas con un blanco, generalmente aire. Las diferencias entre los dos haces se representan mediante un pico o banda de transmisión a una determinada longitud de onda.

Los denominados de tipo transformada de Fourier se basan en hacer incidir todo el espectro de longitudes de onda varias veces sobre la muestra. Para obtener el espectro se recoge la radiación transmitida como una señal de interferencias (interferograma) y se le aplica la operación matemática de transformada de Fourier.

En el presente PFC, el procedimiento seguido para la realización de los espectros, teniendo en cuenta que las muestras analizadas son sólidas, fue el siguiente: con una espátula se coloca la muestra sólida, en forma de polvo, directamente sobre la ventana del equipo. Con la ayuda de una prensa, formada por una punta de zafiro, se presiona la muestra.

La finalidad es formar una fina capa en cuya superficie penetre ligeramente y se refleja el rayo de luz del espectrómetro y, a su vez, evitar la acumulación de aire que provoca interferencias en los resultados.

### 5.2.2. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El espectrómetro utilizado para realizar los espectos de RMN de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) fue un equipo Brucker AMX-300 de transformada de Fourier que opera a 300,13 MHz para el de protón y a 75,48 MHz para el de carbono (Figura 5.4).



**Figura 5.4.** Panel de control del espectrómetro Brucker AMX-300.

#### 5.2.2.1. Técnica experimental de RMN.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es la herramienta analítica que proporciona mayor información estructural y estereoquímica en un tiempo asequible. La técnica no es destructiva y tiene aplicaciones en todas las áreas de la Química y en algunas de la Biología.

La Resonancia Magnética Nuclear es una espectroscopia de absorción cuyo fundamento es la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo magnéticamente activo, que está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación. Entre los núcleos más frecuentes en los compuestos orgánicos son magnéticamente activos el protón ( $^1\text{H}$ ), carbono ( $^{13}\text{C}$ ), nitrógeno ( $^{15}\text{N}$ ), fósforo ( $^{31}\text{P}$ ) y flúor ( $^{19}\text{F}$ ).

Las muestras, generalmente, son disoluciones en disolventes que no tengan átomos de protio ( $^1\text{H}$ ). Frecuentemente se usan el deuterocloroformo, hexadeuterodimetilsulfóxido, óxido de deuterio, deuterobenceno, deuteropiridina y otros.

Los espectros más comunes son representaciones de la intensidad de absorción frente a la frecuencia de resonancia (generalmente a través del parámetro  $\delta$ ) y presentan señales cuya posición, forma y tamaño están íntimamente relacionadas con la estructura molecular. El análisis detallado de estos espectros proporciona valiosa información estructural y estereoquímica. Espectros bidimensionales permiten relaciones entre distintos núcleos o distintas magnitudes del mismo núcleo.

### 5.2.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El equipo utilizado para realizar la DSC fue el modelo Q100 (TA-Instruments), provisto con un sistema automático de recogida de muestra (DSC Autosampler); y un muestreador automático con capacidad para 50 muestras y 5 referencias. Además, el equipo cuenta con un sistema de refrigeración mecánica sin nitrógeno líquido (RCS), que permite trabajar con temperaturas en el rango  $-90^{\circ}\text{C}$  a  $550^{\circ}\text{C}$ . El equipo requiere tres calibraciones en temperatura y energía: sin muestras, con zafiro y mediante la fusión de patrones metálicos de indio ( $T_m = 42(9,7)5\text{ K}$ ,  $\Delta H_m = 3,267\text{ kJ/mol}$ ) (Figura 5.5).

Las muestras se pesaron en una balanza electrónica Mettler AC 100 con precisión de 0,1 mg o bien en una balanza Mettler P1210 con precisión de 10 mg, en función de la cantidad de muestra a pesar y de la precisión deseada.



**Figura 5.5.** Calorímetro modelo Q100 (TA-Instruments).

#### 5.2.3.1. Técnica experimental del DSC

Las técnicas de análisis térmico se basan en el hecho de que ciertas propiedades de los materiales sufren cambios como consecuencia de ser sometidos a un programa de calentamiento o enfriamiento controlado. Dependiendo de la propiedad que se mida, se definen varias técnicas, las más comunes de las cuales se citan en la Tabla 5.1. En el presente proyecto se utilizó la calorimetría diferencial de barrido (DSC) para realizar el análisis térmico de las diferentes muestras.



**Tabla 5.1.** Principales técnicas de Análisis Térmico.

Nombre	Abreviatura	Propiedad medida
Análisis térmico diferencial	DTA	Diferencia de temperatura
Calorimetría diferencial de barrido	DSC	Flujo de calor
Termogravimetría	TG	Pérdida de peso
Análisis Dinamomecánico	DMA	Viscoelasticidad

Un calorímetro diferencial de barrido (DSC) es un instrumento que permite observar y cuantificar las diferentes transiciones energéticas que puede sufrir un material, ya sea por calentamiento o enfriamiento, con o sin cambio de fase o bien por reacción química. Uno de los fenómenos que se ha estudiado a partir del DSC es el calor liberado durante el proceso de cristalización del polímero estudiado.

Si se asume que el calor de reacción y el grado de conversión son directamente proporcionales, la velocidad de reacción y el grado de conversión se pueden calcular utilizando las ecuaciones siguientes:

$$\frac{d\alpha}{dt} = \frac{(dH / dt)_t}{\Delta H_{total}} \quad (\text{Ec 5.1})$$

$$\alpha = \frac{\int_0^t (dH / dt)_t dt}{\Delta H_{total}} \quad (\text{Ec 5.2})$$

donde  $(dH/dt)_t$ , representa el calor liberado en un tiempo  $t$ ,  $\Delta H_{total}$  es el calor liberado durante todo el proceso reactivo y  $\Delta H_t$  es el calor liberado hasta un instante  $t$ .

Para realizar la caracterización térmica de las microfibras de los polímeros (se usaron 5mg de microfibra prensada) se realizó un protocolo de cuatro barridos, mediante el cual se determinan las temperaturas de fusión y cristalización, así como las entalpías asociadas. La Tabla 5.2. muestra el procedimiento seguido durante este protocolo.

**Tabla 5.2.** Protocolo seguido para la caracterización térmica de las muestras.

Barrido	Descripción	Determinación
1	<b>Calentamiento</b> de la muestra desde 20 °C hasta 190 °C a una velocidad de 20 °C/min	$T_m, \Delta H_m$
2	<b>Enfriamiento</b> a 10 °C/min desde 270 °C hasta -90 °C	$T_c, \Delta H_c$
3	<b>Calentamiento</b> a 20 °C/min desde -90 °C hasta 190 °C	$T_m, \Delta H_m$
	<b>Enfriamiento</b> rápido desde 270 °C hasta -50 a -90 °C para obtener el polímero en estado amorfo	
4	<b>Calentamiento</b> a 20 °C/min desde -50 °C hasta 190 °C	$T_m, \Delta H_m$

La DSC es una técnica donde la diferencia de calor entre la referencia y la muestra tratada es medida como una función de la temperatura. Este método permite observar y cuantificar las diferentes transiciones energéticas que puede sufrir un material, ya sea por calentamiento o por enfriamiento, con o sin cambio de fase, o bien por reacción química. Uno de los fenómenos que permite estudiar el DSC es el calor liberado durante el proceso de cristalización del polímero analizado. Así, para un material polimérico las transiciones que pueden observarse en un termograma son: la transición vítrea ( $T_g$ ), la fusión ( $T_f$ ) y la cristalización ( $T_c$ ).

En general una calorimetría de polímeros consta de cuatro barridos, las realizadas en este estudio están formadas por:

- Primer calentamiento: Calentamiento de la muestra desde temperatura ambiente hasta 170°C a una velocidad de 20°C/min y mantenida durante 1 minuto a la temperatura de 170°C para obtener la temperatura de fusión ( $T_m$ ). Por norma general se manifiesta mediante un único pico endotérmico relativamente ancho, pero en ocasiones y como es el caso que nos aplica pueden aparecer varios picos. De este primer barrido se pueden obtener informaciones relativas al grado de cristalinidad y la temperatura de fusión de la muestra ( $T_m$ )

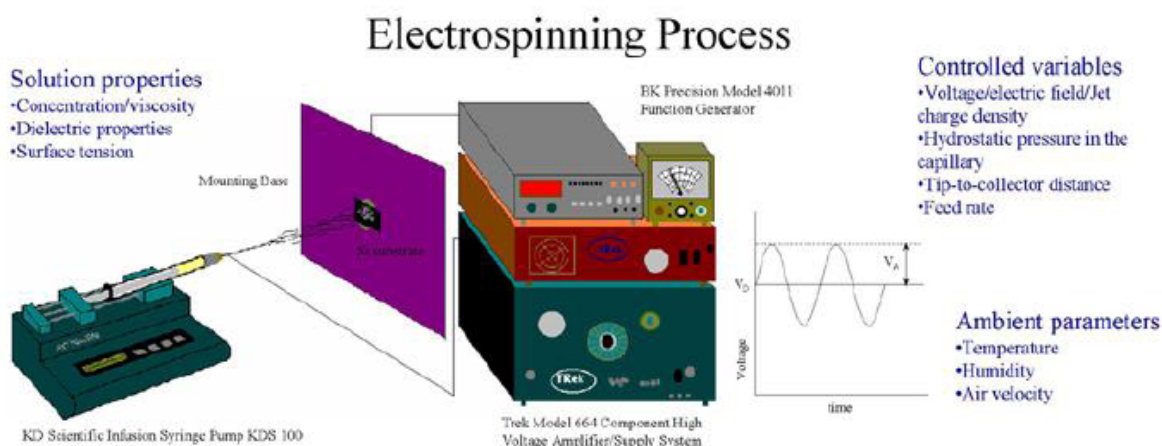
- **Enfriamiento:** Se procede al enfriamiento de la muestra desde la temperatura máxima adquirida hasta  $-90^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de enfriamiento de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Este barrido se lleva a cabo inmediatamente después del primer barrido y permite determinar la cristalización del material fundido, mediante un pico exotérmico ( $T_c$ ), en este barrido se extrae gracias a la posición y área del pico, el subenfriamiento y la cristalización alcanzada para la velocidad de enfriamiento aplicada.
- **Segundo calentamiento:** Se recalienta la muestra de nuevo, después de mantenerla 1 minuto a  $-90^{\circ}\text{C}$ , a una velocidad de  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta la temperatura de fusión. Este recalentamiento permite constatar la capacidad de reproducción de las transiciones y a su vez obtener datos de la muestra cristalizada del fundido.
- **Tercer calentamiento.** Éste se lleva a cabo después de haber llevado la muestra a través de un rápido enfriamiento a  $-90^{\circ}\text{C}$ , el calentamiento se realiza a una velocidad de  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , con el que se puede determinar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), en los polímero amorfos aparece como una discontinuidad en la línea base, adicionalmente se puede observar una cristalización el frío y de nuevo la temperatura de fusión.

En el caso que nos aplica las muestras empleadas para el análisis calorimétrico fueron de 5 mg en estado sólido que se depositan en una cápsula de aluminio, que posteriormente se coloca en el muestreador automático del que dispone el equipo de DSC.

#### 5.2.4. Electrospinning (Electrohilado)

El equipo de electrospinning (Figura 5.6) consta de los siguientes componentes:

- Bomba de inyección KdScientific 100 de 230V y 50/60Hz que permite trabajar con jeringas de distintos volúmenes y regular el equipo para proporcionar el flujo necesario. (10  $\mu\text{l}$  a 15 ml). Estas se controlan mediante un menú en el cual se selecciona el fabricante de la jeringa, el tamaño de la jeringa, la velocidad y el flujo.
- Fuente de alimentación Gamma High Voltage Research que proporciona alto voltaje, en el rango de 0-30kV y una intensidad de 0-750 mA..
- Colector, placa de aluminio (20x20 cm) con soporte dieléctrico de PVC que permite variar la altura del colector.



**Figura 5.6.** Esquema del equipo de electrospinning.

### 5.2.5. Microscopio Óptico

Microscopio óptico Carl Zeiss Standard 20 y microscopio Carl Zeiss AXIOSCOP 40 con una cámara AxioCam MRC5 acoplada y conectada al software AxioVision 4.8, que digitaliza las imágenes recogidas por la cámara y que permite obtener imágenes de las muestras para su posterior estudio o clasificación. Este microscopio fue utilizado para realizar un registro de imágenes rápido para el análisis de las condiciones de electrohilado de los materiales durante el proceso de optimización de los parámetros del electrospinning.



**Figura 5.5.** Microscopio óptico Carl Zeiss AXIOSCOP 40

### 5.2.6. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

En este estudio se ha trabajado con un TEM modelo Philips Tecnai en el cual las muestras se disponen sobre rejillas de cobre de 50 mm de diámetro recubiertas de carbono. Las imágenes fueron obtenidas a bajo voltaje, con la finalidad de realizar las mediciones del diámetro de las fibras obtenidas por electrohilado.

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) emite un haz de electrones dirigido hacia el objeto cuya imagen se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra. Para utilizar un microscopio electrónico de transmisión debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de angstrom. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar la imagen de un objeto hasta un millón de veces.

### 5.2.7. Microscopio electrónico de barrido (SEM)

El equipo es un Carl Zeiss Neon 40. Previo a la visualización de las muestras es imprescindible realizar un tratamiento de las mismas, aplicando un recubrimiento conductivo, en el caso que nos aplica un film de carbono de unos 5-7nm de espesor, mediante un evaporador Balzers SCD-004 Sputter-coater. Este recubrimiento previene la formación de carga eléctrica sobre la muestra debido a la baja conductividad del polímero y que dicha carga interaccione con el haz de electrones incidente. Si esto ocurriera se distorsionarían las imágenes, por este motivo es imprescindible un recubrimiento óptimo para la obtención de imágenes. Además, el recubrimiento tiene función protectora, desde que los polímeros funden cuando son expuestos al alto voltaje del haz de electrones.

En el microscopio electrónico de barrido (SEM) la muestra es recubierta con una capa de metal delgado, y es barrida con electrones enviados desde un cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectadas. Su resolución está entre 3 y 20 nm, dependiendo del microscopio. Permite obtener imágenes de gran resolución en materiales pétreos, metálicos y orgánicos. La luz se sustituye por un haz de electrones, las lentes por electroimanes y las muestras se hacen conductoras metalizando su superficie.



**Figura 5.6.** Microscopio TEM Philips Tecnai

### **5.3. Adhesión y proliferación celular: Biocompatibilidad *in-vitro***

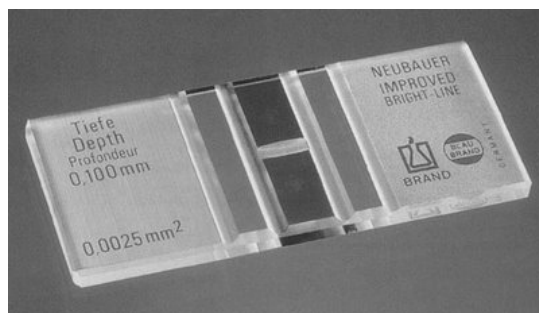
Se ha estimado que los diferentes tejidos y órganos de un adulto contienen más de  $10^{14}$  de células. Todas éstas se derivan originalmente de una sola célula que crece y se divide. Si se colocaran bacterias en un medio de cultivo adecuado, crecerían y se dividirían hasta que el medio quedara saturado con esas células. De igual modo, puede hacerse que células aisladas de ciertos tejidos, crezcan y se dividían en un medio de cultivo artificial, constituyendo lo que se conoce como cultivo de tejidos.

El cultivo de células inmortalizadas (células derivadas de tumores, o células transformadas por elementos virales) es una metodología que permite tener de forma continua células. Estos cultivos celulares tienen como ventaja que no requieren el sacrificio de animales, ni el aislamiento y purificación celular. Por este motivo, los primeros ensayos de biocompatibilidad son realizados usando células inmortalizadas. Como, biocompatibilidad *in-vitro* puede

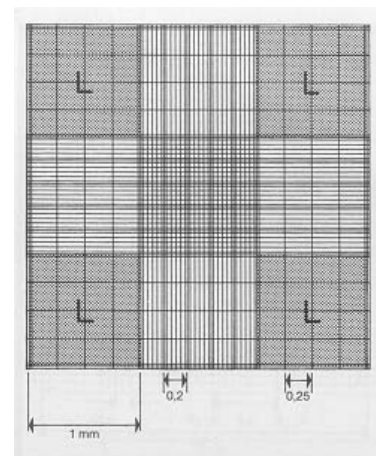
entenderse que el material no produce muerte celular por toxicidad celular (citotoxicidad) y se comporta como un soporte apto para la adhesión y proliferación de células.

Para este estudio se usaron células inmortalizadas MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) y células tumorales HEp-2 (células humanas derivadas de carcinoma de laringe), ambas líneas celulares son de tipo epitelial. Las células fueron cultivadas en Dulbecco medio Eagle modificado (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina y 2 mM de L-glutamina a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> y 95 % de aire. El medio de cultivo se cambió cada dos días y, para el subcultivo, las monocapas celulares se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y luego fueron tripsinizadas por incubación con tripsina-EDTA (0,25%) durante 2-5 min a 37 °C. La actividad de la tripsina fue detenida añadiendo medio de cultivo para obtener una suspensión celular.

Finalmente, se determinó la concentración de células en la suspensión por conteo celular directo en una cámara de Neubauer (Figura 5.7), usando el colorante vital azul de trypan al 4% para diferenciar células vivas de células muertas. Este colorante penetra en las células muertas, y las colorea de azul, mientras que las células vivas no se tiñen. El principio de esta tinción diferencial, corresponde a la estabilidad de la membrana celular, las células muertas tienen la membrana celular dañada, mientras que las células vivas tienen una membrana celular integra o intacta y por ello no permiten la penetración del colorante al interior citoplasmático.



(a)



(b)

**Figura 5.7.** Cámara de Neubauer. Aspecto exterior (a) y el sistema de conteo usado (b)



Todos los experimentos de biocompatibilidad in-vitro fueron realizados con suspensiones celulares con viabilidad celular mayor o igual al 95 %. Se requiere esta alta viabilidad celular inicial para poder evaluar la adhesión y proliferación de las células en contacto directo con el material, la pérdida de viabilidad celular durante los experimentos de biocompatibilidad pueden explicarse por citotoxicidad (daño celular y/o muerte celular) inducida por los materiales o productos generados a partir del material ensayado.

Para los ensayos de biocompatibilidad in-vitro, las matrices de microfibras fueron recogidas sobre cubreobjetos circulares de 1,4 cm de diámetro. Estos cubreobjetos cubiertos con matrices de microfibras fueron colocados en los pocillos (well) de placas de cultivo de 24 pocillos, las placas de cultivo son de poliestireno tratado para el cultivo celular (TCPS), este tratamiento consiste la modificación de la superficie de PS por tratamiento con plasmon. Finalmente, las placas de cultivo preparadas con las matrices de microfibras a evaluar fueron esterilizadas por irradiación UV durante 15 min en el interior de una cabina de bioseguridad tipo II. Luego, las células se exponen al contacto directo con la superficie del material para evaluar tanto la adherencia como la proliferación celular. Las matrices de microfibras no requirieron acondicionamiento previo con medio de cultivo antes de la realización de los cultivos celulares.

Alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  con  $5 \times 10^4$  células (para la prueba de adherencia) ó  $2 \times 10^4$  células (para el ensayo de proliferación) se depositaron en los discos de microfibras colocadas en cada pocillo de la placa de cultivo. La placa se incubó en condiciones de cultivo durante 60 minutos para permitir la adhesión celular a la superficie del material. Luego, 1 mL del medio de cultivo fue añadido a cada pocillo. Los controles de la adherencia y proliferación se obtuvieron por cultivo de células en la superficie de TCPS (placa).

La viabilidad celular fue evaluada cuantitativamente por el ensayo del MTT. La adhesión celular se evaluó después de 24 h de cultivo y la proliferación celular fue evaluada a los 7 días de cultivo. Los resultados fueron normalizados por unidad de superficie ( $\text{cm}^2$ ). Cada experimento fue repetido 5 veces de manera independiente para posteriormente ser promediado y representado gráficamente. Se realizó el análisis estadístico de varianza (ANOVA) seguido del Test de Tukey con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). Para ello, se usó el software OriginPro v.8 (Microcal Origin, USA).



El ensayo del MTT (3 - (4,5-dimethylthiazol-2-il) -2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro) se basa en la determinación de la viabilidad celular. Las células viables contienen deshidrogenasas que convierten el reactivo MTT en sal de formazán. Esta transformación del MTT a formazán se evidencia por la aparición intracelular de microcristales. La formación de formazán es cuantificable cuando los cristales son disueltos y se realiza lectura de absorbancia a 570 nm. Así, el número de células o concentración celular es directamente proporcional a la absorbancia a 570 nm, lo cual permite preparar a curva standard de recuento celular en función de la absorbancia.

La evaluación de la adhesión y proliferación celular en las matrices de microfibras se realizó por la determinación de la viabilidad celular usando como reactivo el MTT. Para ello, finalizado el tiempo de cultivo, se añadió en el medio de cultivo 50  $\mu$ L de reactivo MTT preparado en concentración de 3 mg/mL. Los cultivos fueron mantenidos durante 2-3 h en condiciones de cultivo. Luego, el medio de cultivo fue aspirado y desechado. Los cubreobjetos recubiertos con las matrices de microfibras fueron colocados en pocillos de una placa limpia (Figura 5.8.) Finalmente, se añade 0.2-0.5 mL de la mezcla DMSO (Dimetilsulfóxido)/Metanol/Agua (20:70:10 en vol.) a cada pocillo, también se añade 0.2-0.5 mL de DMSO/MeOH/Agua a los pocillos de la placa donde se realizó el cultivo, así se puede cuantificar las células viables sobre las microfibras y sobre la placa. Las placas fueron mantenidas en agitación orbital durante 15 min para disolver los cristales de formazán en el DMSO. Luego, el DMSO/MeOH/Agua es aspirado y una alícuota depositada en una placa de ELISA para leer la absorbancia a 570 nm y calcular el recuento celular.



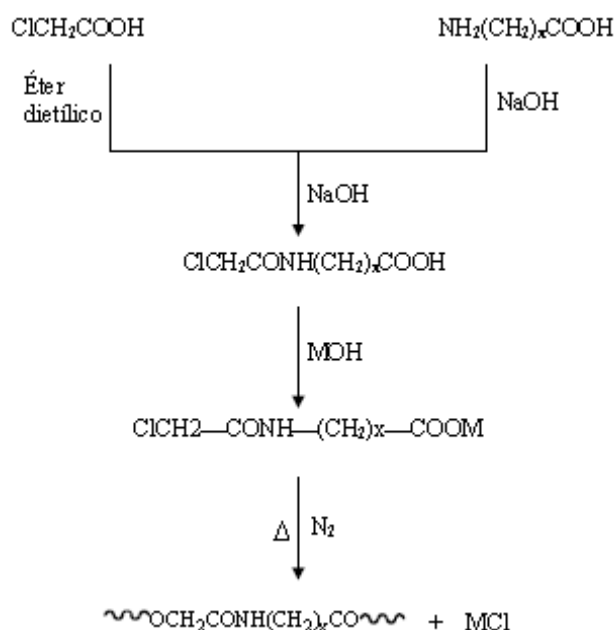
**Figura 5.8.** Viabilidad celular en un experimento de proliferación celular. Se evidencia la formación de los cristales de formazán en relación a las células viables sobre las microfibras evaluadas.

Para tener evidencia microscópica de la adhesión y proliferación celular sobre las matrices de microfibras. Se procede con el siguiente protocolo. Una vez finalizado el cultivo celular. Los discos de microfibras fueron fijados en glutaraldehído al 2.5%-PBS durante la noche a 4 °C. Luego, fueron deshidratados progresivamente por lavado en una batería de alcoholes (30 °, 50 °, 70 °, 90 °, 95 ° y 100 °) a 4 °C, los discos fueron deshidratados en cada alcohol durante 30 min. Finalmente, se mantiene en alcohol absoluto (100°) a 4 °C. Estas muestras fueron preparadas para ser observadas por SEM (microscopía electrónica de barrido). Para ello, las muestras deshidratadas fueron secadas a 4 °C, y luego, fueron recubiertas con carbono en un electroevaporador antes de su observación en un SEM modelo Neón40 Zeiss.

## 6. Resultados y Discusión

### 6.1. Síntesis de la Poliesteramida poli(GLC-AMH)

La poliesteramida poli(GLC-AMH) fue sintetizada a través de un procedimiento en cuatro pasos que incluye una reacción de poliesterificación con la formación de un haluro metálico como fuerza impulsora ("driving force") [46], ver Figura 6.1.



**Figura 6.1.** Procedimiento para la polimerización en estado sólido del poli(GLC-AMH). 6-aminohexanoico:  $x=5$ ; M: metal.

En un primer paso se lleva a cabo la **reacción**, para ello se realiza una adición gota a gota de cloruro de cloroacetilo (0,11 mol) disuelto en 10 ml de éter etílico y una solución acuosa 1M de NaOH (0,1 mol) con la ayuda de un embudo de decantación, sobre 50 ml de una solución acuosa de ácido 6-aminohexanoico (0,1 mol) y NaOH (0,1 mol) preparados en un vaso de precipitado de 250 ml. Durante la adición de la disolución de cloruro de cloroacetil sobre la solución acuosa del ácido, se mantiene una agitación continua de la disolución durante 1 h en un baño de hielo, y se controla que el pH se mantenga en valor de 11-12, con la solución 1M de NaOH que se va añadiendo por goteo y que neutraliza el HCl que se produce durante la reacción.

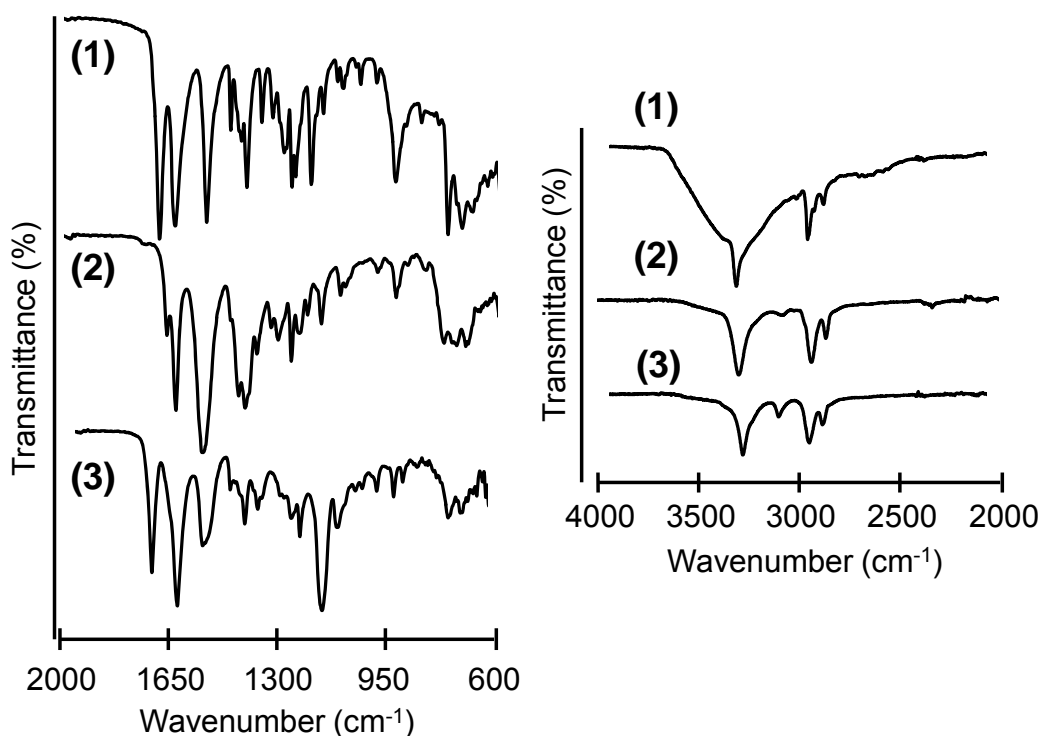
Una vez finalizada la adicción y cuando se haya evaporado por completo todo el éter etílico, se lleva a cabo el proceso de **acidificación**. Después de la acidificación con una solución 1M

de HCl hasta pH 1,5, se obtuvo un sólido blanco, el ácido cloroacetil-6-aminohexanoico ( $\text{ClCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$ ), que se separa por filtración en vacío usando un embudo de Buchner. Este sólido fue lavado con agua y éter etílico.

El tercer paso de la formación de la poliésteramida es la **recristalización** en 10 ml de agua (rendimiento del 80%), con un montaje de destilación con reflujo, con agitación y en un baño de silicona a 100°C. Una vez disuelto, se deja enfriar, formándose 2 fases, se introduce en frío para ayudar a la cristalización.

El sólido formado se disuelve en la mínima cantidad de agua posible para **neutralizarlo** y formar el monómero de sal sódica y con la ayuda de un liofilizador se extrae toda el agua contenida.

Para caracterizar la poliésteramida sintetizada se realizaron espectroscopía FTIR y calorimetría DSC. Para estos análisis, unas pequeñas porciones de la poliésteramida sintetizada fueron fundidas en una placa calefactora y el material enfriado fue analizado. En la Figura 6.2 se muestran los espectros FTIR de la poliésteramida sintetizada y de los productos intermedios producidos durante su síntesis, y la Tabla 6.1 muestra la interpretación de los espectros FTIR.



**Figura 6.2.** Espectros FTIR de la Poliésteramida poli(GLC-AMH). a) Espectros de referencia en la región de 600-2000  $\text{cm}^{-1}$  para el ácido cloroacetil-6-aminohexanoico (1), monómero (GLC-AMH) (2), y polímero poli(GLC-AMH) (3). b) Espectros en la región de 2000-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

**Tabla 6.1** Interpretación del espectro FTIR del N-cloroacetil-6-aminohexanoico (a) y del poli(GLC-AMH) (b).

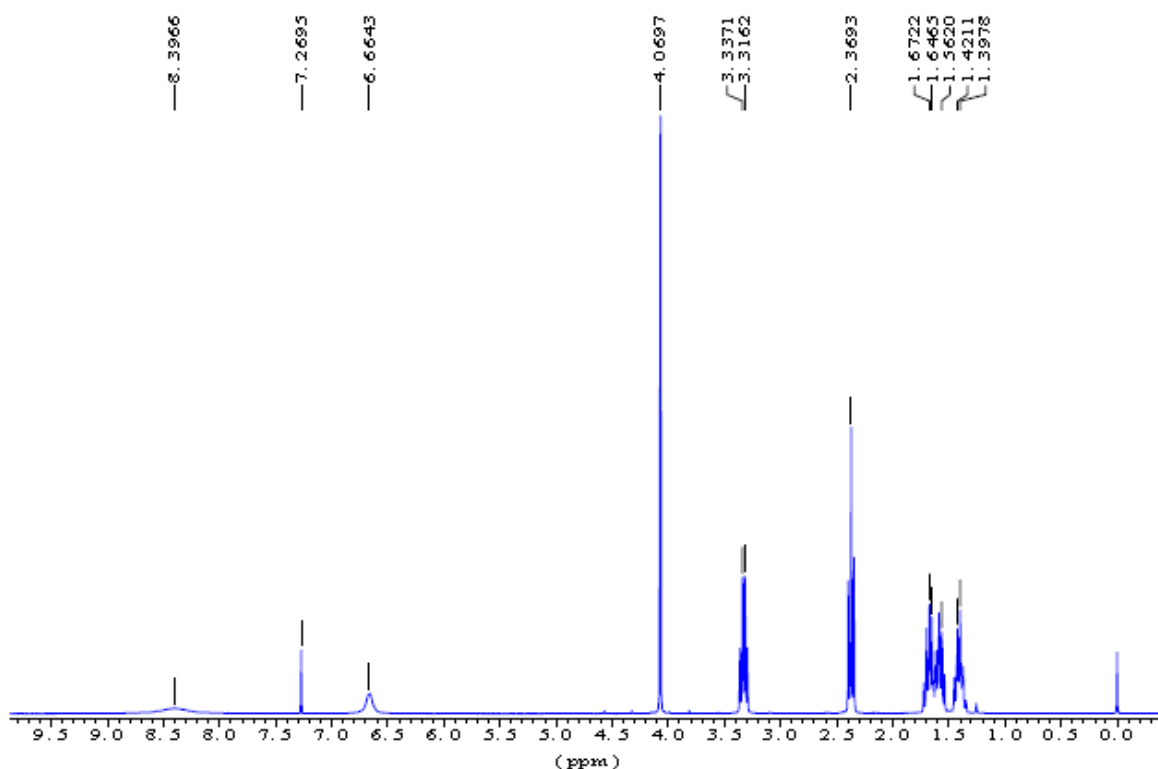
(a)

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Grupo	Tipo de vibración
3331.14	Enlace N-H	Vibración de tensión del N-H
2946.11	Enlace C-H	Vibración del enlace C-H
1696.99	Enlace C=O	Vibración de tensión del enlace C=O
1646.52	Amida I	Combinación de tensión del enlace C=O de amida y flexión del enlace N-H
1543.13	Amida II	Combinación de tensión del enlace C-N y flexión del enlace N-H
1410.53	Enlace C-H	Deformación asimétrica del C-H
1359.95	Amida III	
1261.57	Enlace C-O	Vibración simétrica y asimétrica del enlace C-O
928.17	Enlace C-C	Vibración del C-C de alcano
758.19	Enlace C-H	Torsión del enlace C-H

(b)

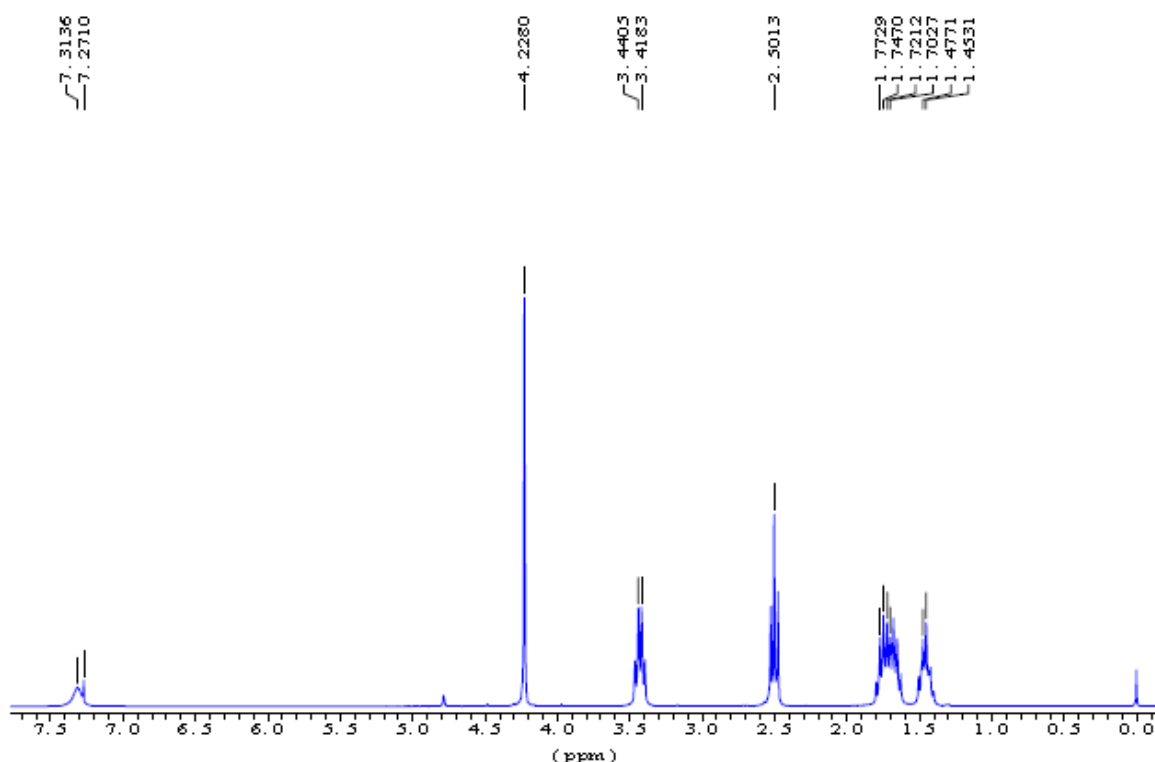
$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Asignación	Tipo de vibración
3295	Enlace N-H	Vibración de tensión del N-H ( Amida A )
3101	Amida B	
2943-2868	Enlace C-H	Vibración del enlace C-H
1743	Enlace C=O	Vibración de tensión del enlace C=O
1657	Amida I	Combinación de la vibración de tensión del enlace C=O de amida y de flexión del enlace N-H
1565	Amida II	Combinación de la vibración de tensión del enlace C-N y de flexión del enlace N-H
1378	Amida III	
1165-1107	Enlace C-O	Vibración simétrica y asimétrica del C-O
971	Enlace C-C	Vibración simétrica y asimétrica del C-O

En la Figura 6.3 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del N-cloroacetil-6-aminohexanoico, indicándose en la tabla inserta los átomos de H a los que corresponden cada una de las señales observadas. En la Figura 6.4 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la sal sódica del N-cloroacetil-6-aminohexanoico. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN obtenidos de la sal sintetizada es análogo al de su dímero ácido correspondiente, porque la formación de la sal no implica cambios significativos en los desplazamientos de las señales del espectro.



$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	Nº de H	Asignación
6.66	s	1	$\text{Cl-CH}_2\text{-CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
4.06	s	2	$\text{Cl-CH}_2\text{-CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
3.32	q	2	$\text{Cl-CH}_2\text{-CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
2.36	t	2	$\text{Cl-CH}_2\text{-CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
1.65	m	4	$\text{Cl-CH}_2\text{-CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
1.41	m	2	$\text{Cl-CH}_2\text{-CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$

**Figura 6.3.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del N-cloroacetil-6-aminohexanoico. (Disolvente: TFA/ $\text{CDCl}_3$ ). En la tabla se muestra la asignación de señales del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del N-cloroacetil-6-aminohexanoico.

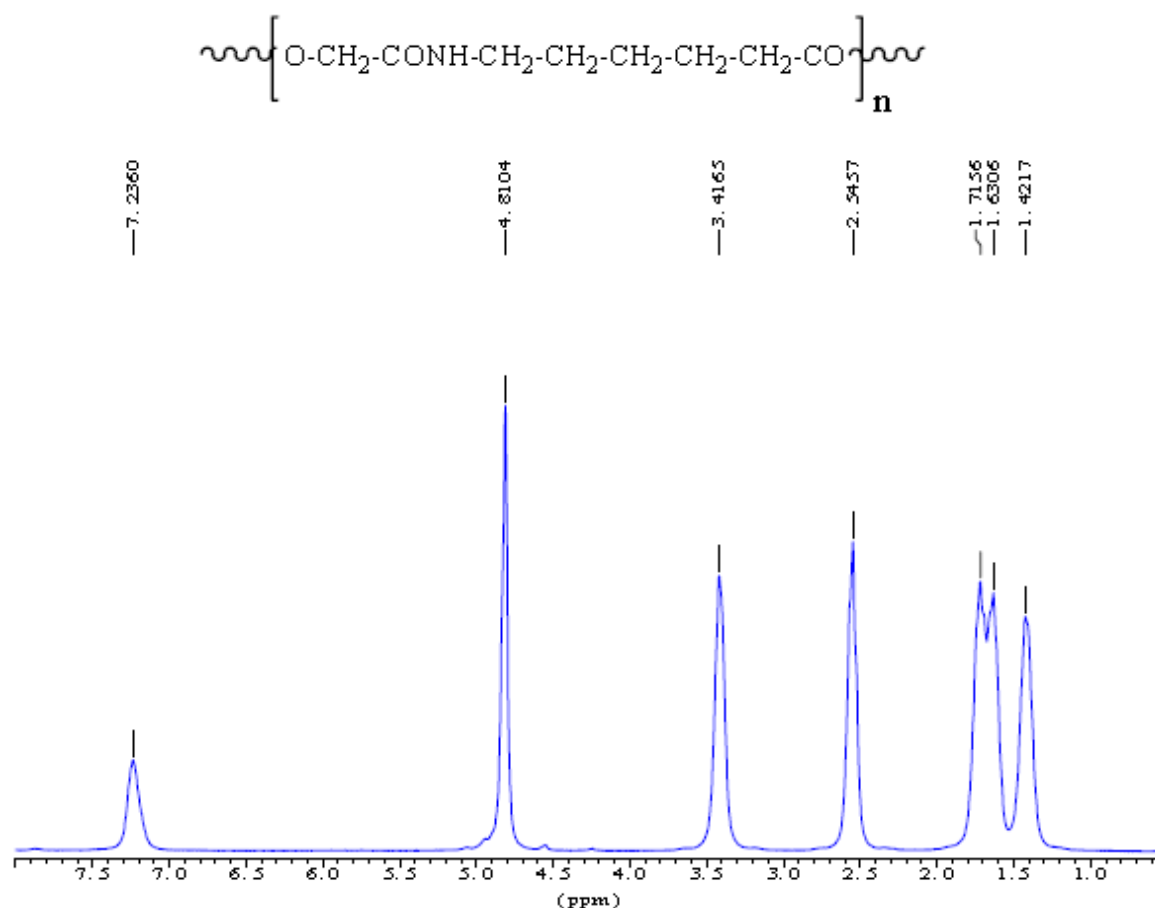


**Figura 6.4.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la sal sódica del N-cloroacetil-6-aminohexanoico.

En la Figura 6.5 se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del polímero poli(GLC-AMH). La asignación de picos es muy similar a la realizada para el dímero N-cloroacetil-6-aminohexanoico (tabla inserta en la Figura 6.3). Puesto que la PEA fue de peso molecular considerable, en el espectro RMN no se observan las señales correspondientes a los grupos terminales.

Rutinariamente, para el poli(GLC-AMH) preparado a partir de la sal sódica se obtiene una viscosidad intrínseca de 0.74 dL/g, y pesos moleculares de 12150 g/mol ( $M_n$ ) y 33350 g/mol ( $M_w$ ) con un índice de polidispersidad de 2.746 (PI). La solubilidad estudiada cualitativamente indica que este polímero es insoluble en éter dietílico, agua, acetona, etanol, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, y dimetilsulfóxido, pero es soluble a temperatura ambiente tanto en ácido fórmico y ácido dicloroacético. Esta PEA de manera similar a algunas poliamidas hidrofílicas (p.e., nylon 6, nylon 6,6 y nylon 6,10) puede absorber 5.2% de humedad después de 24-48 h de ser expuesta a un medio con 100% de H.R. a 20 °C [47].

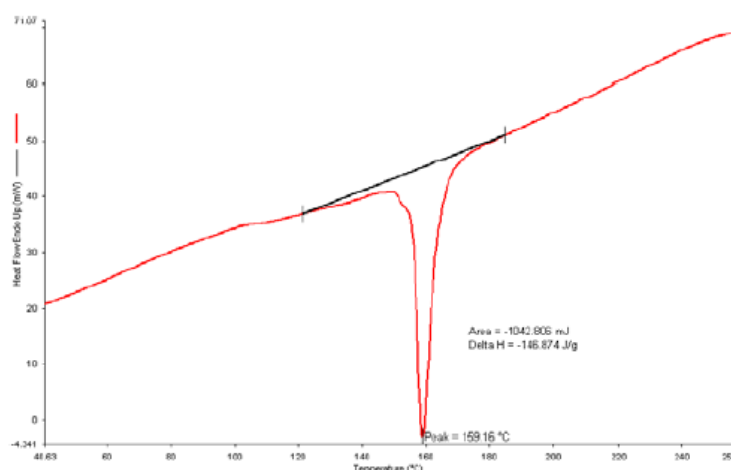
Como se ha comentado anteriormente, el poli(GLC-AMH) se obtiene por polimerización en estado sólido a partir de la sal (sódica o potásica). Para conseguir una buena polimerización en estado sólido, la sal fue analizada térmicamente por DSC para comprobar su polimerizabilidad. Así, la sal sódica debe mostrar una entalpía de polimerización mediante un pico exotérmico a 159 °C (Figura 6.5).



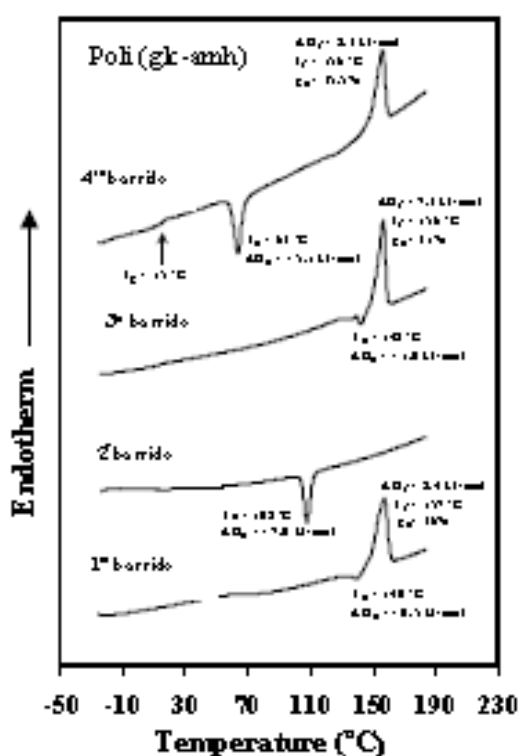
**Figura 6.4.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del poli(GLC-AMH). En la parte superior se muestra la estructura del polímero.

En las curvas de DSC (Figura 6.6) correspondientes al poli (GLC-AMH), se observa como en el primer barrido aparece un pico endotérmico a 157°C correspondiente a la fusión del polímero. También puede observarse un pico endotérmico pequeño justo antes de la fusión, correspondiente a un proceso de reorganización molecular. La aparición de este pico está relacionada con la denominada cristalización “fría”, y significa que el polímero ha solidificado sin cristalizar adecuadamente. En el segundo barrido se observa un pico exotérmico a 108°C, correspondiente a la cristalización del polímero. En el tercer barrido (segundo calentamiento) se advierte la desaparición del pico exotérmico y la reproducibilidad del pico de fusión, esta vez a 156°C. Finalmente, el polímero se somete a un enfriamiento rápido, obteniéndose un polímero amorfo que se somete a un tercer calentamiento, representado por el cuarto barrido, observándose la temperatura de transición vítrea del polímero ( $T_g = 15^\circ\text{C}$ ), el pico exotérmico de cristalización ( $T_c = 63^\circ\text{C}$ ) y el pico de fusión ( $T_f = 156^\circ\text{C}$ ) del polímero.





**Figura 6.5.** DSC de la sal sódica de N-cloroacetil-6-aminohexanoico (1er barrido).



Barridos		Polí (glc-amh)
1 <sup>o</sup>	$T_m$ (°C)	157
	$\Delta H_f$ (J/g)	49.1
	$\Delta H_f$ (kJ/mol)	8.4
	$\chi$ (%)	36
2 <sup>o</sup>	$T_g$ (°C)	108
	$\Delta H_c$ (kJ/mol)	-7
	$T_m$ (°C)	156
	$\Delta H_f$ (J/g)	42.7
3 <sup>er</sup>	$\Delta H_f$ (kJ/mol)	7.3
	$\chi$ (%)	31
	$T_m$ (°C)	156
	$\Delta H_f$ (J/g)	49.1
4 <sup>o</sup>	$\Delta H_f$ (kJ/mol)	8.3
	$\chi$ (%)	35.5
	$T_g$ (°C)	63
	$\Delta H_c$ (kJ/mol)	-5.1
	$T_g$ (°C)	15

**Figura 6.6.** Curvas obtenidas a partir del análisis calorimétrico del poli (GLC-AMH). 1<sup>er</sup> barrido: 1er calentamiento de la muestra a una velocidad de 20°C/min; 2<sup>o</sup> barrido: 1er enfriamiento de la muestra a una velocidad de 10°C/min; 3<sup>er</sup> barrido: 2<sup>o</sup> calentamiento; 4<sup>to</sup> barrido: tercer calentamiento, después del "quenching" de la muestra en N<sub>2</sub> líquido. La Tabla muestra los datos obtenidos de los ensayos de DSC.

## 6.2. Síntesis de Poliésteres (PE)

La preparación de los poliésteres (p.e, los homopolímeros PE(9,9) y PE(9,7)) y sus copoliésteres (p.e, PE (9,9/9,7)-85%, indica un copolímero cuya composición corresponde al 15% de PE(9,7) y 85% de PE(9,9) se realizó mediante una reacción de esterificación. Esta reacción es un proceso de policondensación en masa que consta de dos etapas. La primera consiste en la calefacción de una mezcla de diácido y diol, a una temperatura aproximada de 150°C en una atmósfera de nitrógeno. En ella se forman mayoritariamente oligómeros con grupos hidroxilo terminales. En la segunda fase, con una temperatura aproximada de 200°C, se producen reacciones de transesterificación con eliminación de los dioles que se encuentran en exceso. En esta fase, las macromoléculas alcanzan su tamaño definitivo.

El proceso de síntesis de los diferentes copoliésteres es muy similar para todos ellos, por eso a continuación, se describe la polimerización del PE (9,9) como modelo, y en la Tabla 6.2 se detallan las cantidades de los reactivos para la síntesis, el tiempo de reacción y el rendimiento obtenido para la producción de los PE. El PE (9,9) fue sintetizado de acuerdo al siguiente procedimiento: en un balón de tres bocas y de 100 mL de volumen se introducen 6,67g de ácido azelaico (0,0354 moles), 12,5g de nonanediol (0,08 moles), 2-3 gotas de catalizador tetrabutoxido de titanio y un imán mediano. El balón se sumerge en un baño de silicona, inicialmente a 25°C, y se sitúa el conjunto encima de un agitador magnético que dispone de un sistema de calefacción. Por las bocas laterales se hace circular la corriente de nitrógeno mientras se calienta 7 horas a 150°C.

A continuación se pasa a la segunda etapa conectando la bomba de vacío y aumentando la temperatura. Primero, debido a las características de las bombas de que se dispone, se trabaja con una bomba de vacío a una presión de 15-20 mbar hasta alcanzar aproximadamente unos 180°C y posteriormente desde los 180°C hasta los 200°C se trabaja con otra bomba a 1 mbar. En esta segunda fase, en una de las bocas se coloca un codo conectado a un pequeño balón donde se deja gotear y se recoge el nonanediol que se encuentra en exceso y que se evapora a medida que transcurre la reacción.

Durante el proceso de polimerización se detiene la reacción varias veces para poder limpiar con acetona la parte interior del equipo de vidrio, principalmente las paredes del balón impregnadas con oligómero y los restos de nonanediol. La finalidad de esta limpieza es desplazar el equilibrio y aumentar el peso molecular del poliéster. La polimerización se considera acabada cuando se observa que no se destila más nonanediol y que el polímero fundido en el balón es una masa tan viscosa que impide el giro del imán. Seguidamente, se deja enfriar el producto obtenido.

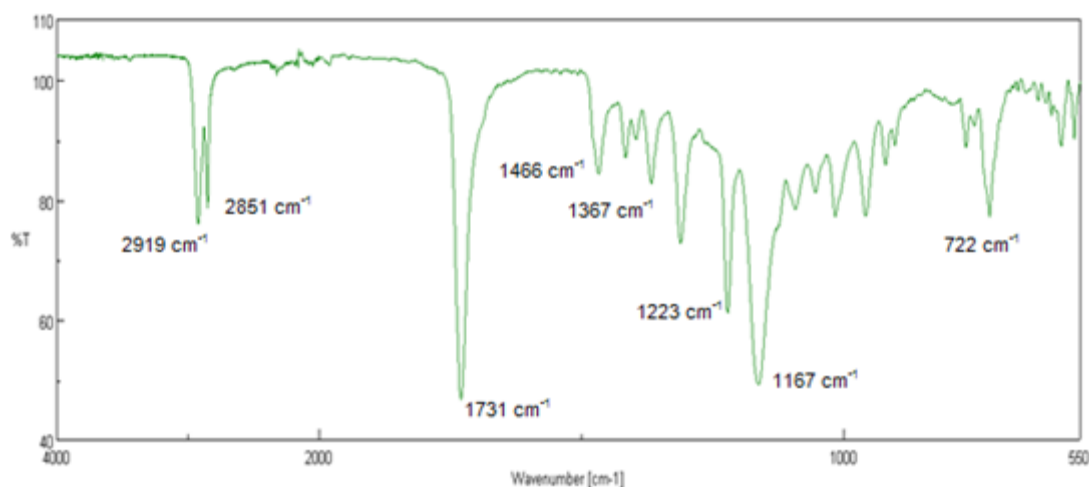
Para purificar el polímero se disuelve en diclorometano y posteriormente se precipita vertiéndolo gota a gota sobre metanol. Finalmente para separar el sólido obtenido del metanol por filtración en un embudo Buchner. Luego se seca al vacío hasta peso constante. A manera de resumen, en la Tabla 6.2 se especifican las cantidades de reactivos usadas en la síntesis de los poliésteres estudiados, así como también el tiempo total, incluidas las dos etapas, y rendimiento de la reacción.

**Tabla 6.2.** Masa de reactivos, tiempo total de la reacción y rendimiento de la síntesis de los PE estudiados. Los copolímeros fueron designados, p.e, PE (9,9/9,7)-x%; donde x representa la composición en porcentaje del PE (9,9), y la composición del PE (9,7) corresponderá a la diferencia (100-x)%.

Copolíéster	t (h)	Nonanedialol (g)	Azelaico (g)	Pimélico (g)	Rendimiento síntesis (%)
PE (9,9)	30	12,50	6,67	0	78,61
PE (9,9/9,7)-85	28	7,55	3,77	0,57	55,09
PE (9,9/9,7)-70	32	7,55	3,10	1,13	82,90
PE (9,9/9,7)-50	31	7,55	2,22	1,89	86,44
PE (9,9/9,7)-30	30	7,55	1,32	2,64	84,68
PE (9,9/9,7)-15	29	7,55	0,66	3,20	57,02
PE (9,7)	30	12,50	0	5,69	74,94

La caracterización de los PEs se realizó de acuerdo a trabajos previos del grupo PSEP [48,49]. En los PE, las bandas de absorción en los espectros FTIR más características son las que corresponden a los enlaces éster y a los C-H. En la Figura 6.7, se muestra el espectro FTIR del PE (9,9) como representativo de la serie de PEs sintetizados. Esta serie de PEs también fue caracterizada por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Figura 6.8 y 6.9, respectivamente). Como representativo el PE (9,9) muestra una UCR de tipo AABB donde ambos monómeros son simétricos, y debido a esta simetría, los desplazamientos químicos de ambos lados de la UCR son idénticos (Figura 6.8). En los copoliésteres que contienen dos diácidos, las señales de estos dos comonómeros coinciden, y en consecuencia los  $^1\text{H}$ -RMN no son útiles para comprobar experimentalmente su composición. Por tal motivo, es necesario realizar el

análisis del  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 6.9), y debido a la simetría de la UCR se muestran las señales que corresponden a la mitad de la UCR.



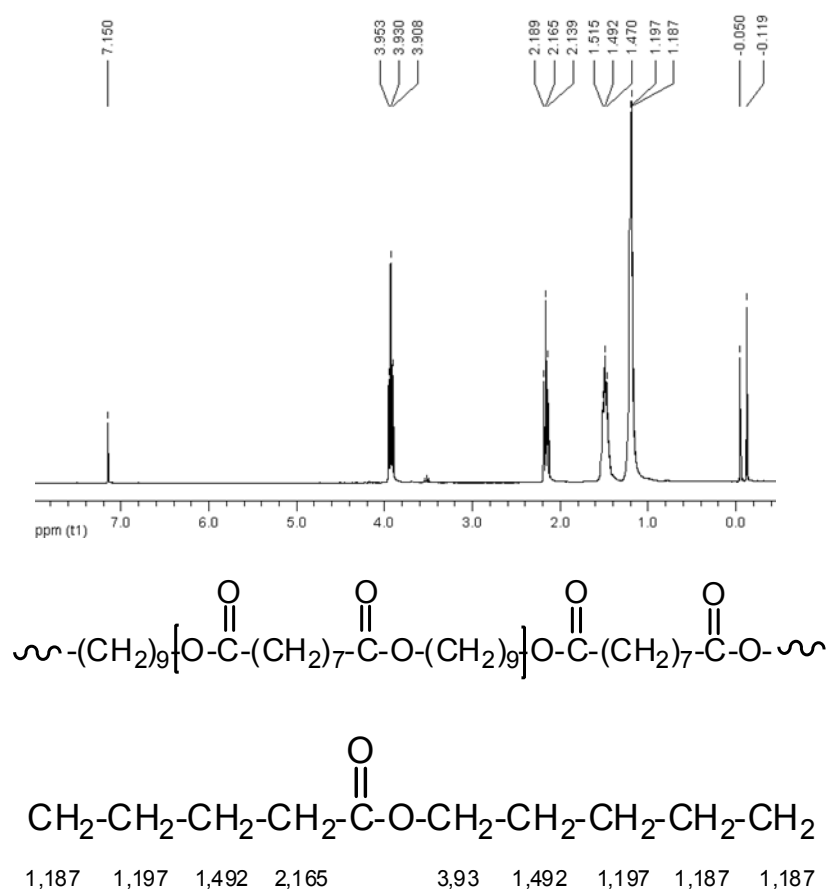
Tipo de vibración	PE		
	PE (9, 9)	(9,9/9,7)-50%	PE (9,7)
Tensión asimétrica del C-H	2919	2926	2931
Tensión simétrica del C-H	2851	2851	2852
Vibración de tensión del C=O	1731	1730	1729
Deformación asimétrica del C-H	1466	1466	1465
Deformación simétrica del C-H	1367	-	1345
Vibración de tensión del C-O-C	1223; 1167	1224; 1169	1242; 1171
Deformación balanceo del C-H	722	723	723

**Figura 6.7.** Espectro FTIR del PE (9,9). La asignación de las bandas características ( $\text{cm}^{-1}$ ) se indica en la tabla inserta.

A partir de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los diferentes copoliésteres es factible determinar experimentalmente su composición. En la Figura 6.10 se muestra la zona de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN del PE(9,9/9,7)-85% y PE(9,9/9,7)-50%, que se ha utilizado para determinar experimentalmente la proporción de los ácidos pimélico y azelaico en los copoliésteres. Las señales que aparecen a 34,3 ppm se utilizaron para calcular la concentración real de diácido presente en cada uno de los PE. El motivo por el cual se escoge esta señal es que en dicha zona se observan dos picos, dónde cada uno de ellos corresponde a los ácidos azelaico y pimélico. En la Figura 6.10, el primer espectro muestra un pico a 34,3 ppm cuya área es mayor que el pico de 34,10 ppm. Este pico de mayor área corresponde al ácido azelaico

porque es el ácido mayoritario en la síntesis del PE(9,9/9,7)-85%. En cambio en el segundo espectro, correspondiente al PE (9,9/9,7)-50%, los dos picos muestran un área similar, ya que las cantidades de ácido son prácticamente iguales. Finalmente, la concentración de cada diácido fue calculada con la siguiente expresión:

$$\% \text{ Real de ácido} = \frac{\text{área del pico de ácido}}{\text{suma de áreas de los picos de cada ácido}} \times 100$$



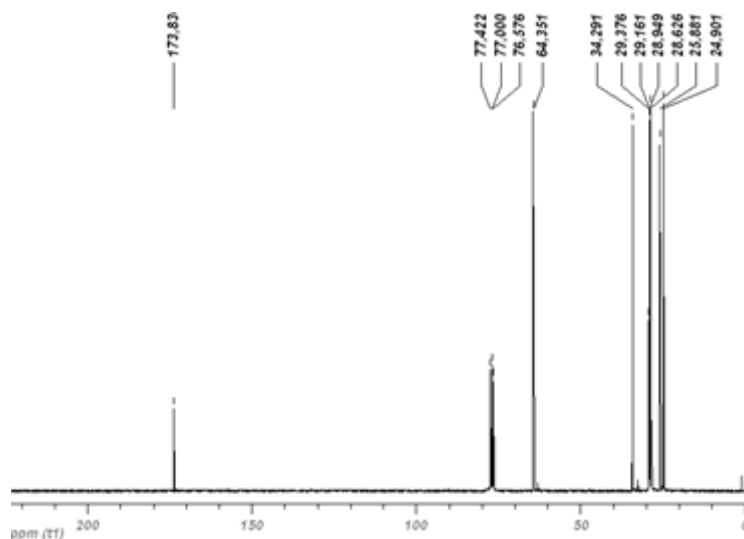
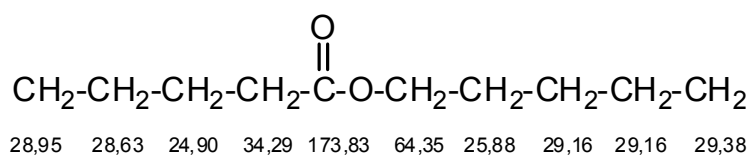
**Figura 6.8.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del PE (9,9). Se muestra la UCR y las señales asignadas a la mitad de la UCR debido a la simetría estructural.

Los PEs también fueron caracterizados por su peso molecular (Tabla 6.3) Para ello, los PEs fueron disueltos hexafluoroisopropanol (HFIP) y se analizaron mediante cromatografía de gel permeación (GPC). Para la serie de PEs, el  $M_n$  tiene valores en el rango de 7200 y 12700 g/mol; y el  $M_w$  entre 19600 y 31700 g/mol. Solo destaca el PE (9,9/9,7)-50% por su mayor peso molecular y mayor polidispersidad.

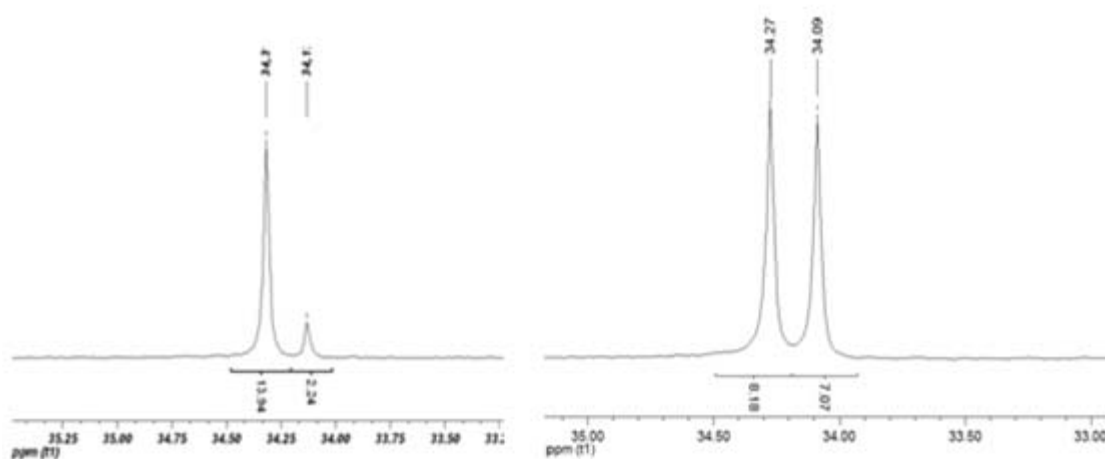
Finalmente, los PEs fueron caracterizados por calorimetría DSC. Representativamente, se muestran las calorimetrías del PE (9,9) y donde se observa un punto de fusión bajo (65 °C), con una cristalización a los 52 °C (Figura 6.11).

**Tabla 6.3.** Peso molecular e índice de polidispersidad para la serie de PEs.

Copoliéster	<i>M<sub>n</sub></i> (g/mol)	<i>M<sub>w</sub></i> (g/mol)	PD
PE (9,9)	7217	19560	2,71
PE (9,9/9,7)-85	12698	31739	2,50
PE (9,9/9,7)-70	11653	29957	2,57
PE (9,9/9,7)-50	18452	59020	3,19
PE (9,9/9,7)-30	9754	23043	2,36
PE (9,9/9,7)-15	9388	21884	2,33
PE (9,7)	7929	19587	2,47



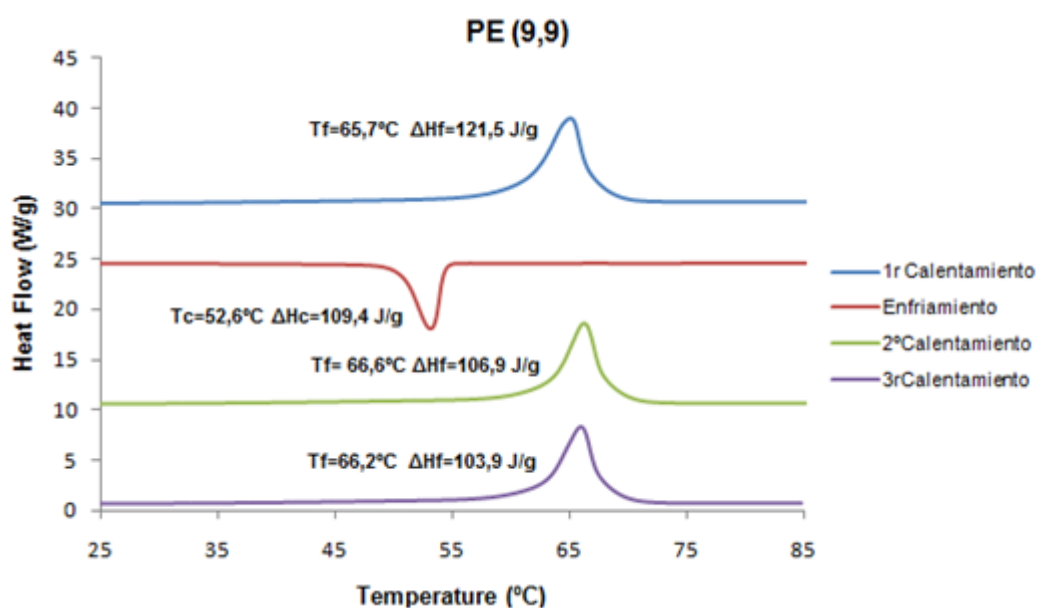
**Figura 6.9.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del PE (9,9). Se muestra las señales asignadas a la mitad de la UCR debido a la simetría estructural.



Copoliéster	Ácido azelaico real (%)	Ácido pimérico real (%)
PE (9,9/9,7)-85	86,2	13,8
PE (9,9/9,7)-70	70,6	29,4
PE (9,9/9,7)-50	53,6	46,4
PE (9,9/9,7)-30	32,2	67,8
PE (9,9/9,7)-15	17,4	82,6

**Figura 6.10.** Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los PE(9,9/9,7)-85% (izq.) y PE(9,9/9,7)-50% (dcha.). La tabla insertada muestra la composición experimental.

Los parámetros calorimétricos de los dos homopolímeros y de los cinco copoliésteres son mostrados en la Tabla 6.4. Como era de esperar, los copoliésteres funden a temperaturas inferiores a los homopolímeros, aunque el descenso mostrado no es muy acusado. Una variación similar se encuentra al comparar las temperaturas de cristalización desde el fundido, el PE (9,9) cristaliza antes que el PE (9,7) y todos los copolímeros cristalizan con la  $T_c$  menor, entre 45-49°C. Las entalpías de fusión y cristalización presentan valores similares, esto indica que la energía que el material necesita para fundir es similar a la que necesita para cristalizar, es decir, no tienen lugar fenómenos de disipación de calor. Del mismo modo, al comparar las  $T_g$  de todos los copolímeros se observan que presentan valores menores que las correspondientes a los polímeros puros. El análisis de la  $T_f$  de la serie de copolímeros en función de su contenido de ácido azelaico demuestra que la  $T_f$  disminuye a medida que aumenta el contenido de ácido azelaico hasta llegar al PE (9,9/9,7)-50%. A partir de este punto, la  $T_f$  aumenta con el contenido de ácido.



**Figura 6.11.** Calorimetría DSC del PE (9,9)

azelaico. Este comportamiento es debido a que los polímeros puros presentan una  $T_f$  mayor. A medida que se añade ácido azelaico, el polímero se comporta de la misma forma que si se añadieran impurezas al material. Al alcanzar una proporción equimolar (50%) las moléculas se distribuyen de forma equivalente, dando en este punto la menor  $T_f$ .

Tabla 6.4. Parámetros calorimétricos de los PE ( $T$  en  $^{\circ}\text{C}$  y  $\Delta H_c$  en  $\text{J/g}$ )

Copolíéster	1r Calentamiento		Enfriamiento		2º Calentamiento		3r Calentamiento		
	$T_f$	$\Delta H_f$	$T_c$	$\Delta H_c$	$T_f$	$\Delta H_f$	$T_f$	$\Delta H_f$	$T_g$
PE (9,9)	65,7	121,5	52,6	109,4	66,6	106,9	66,2	103,9	-45,4
PE (9,9/9,7)-85	64,1	129,4	49,2	106,5	64,4	107,6	64,3	105,5	-55,0
PE (9,9/9,7)-70	62,4	123,7	47,8	106,0	62,5	107,5	62,2	108,1	-50,9
PE (9,9/9,7)-50	61,1	112,2	46,0	95,8	60,5	96,9	60,0	95,9	-54,0
PE (9,9/9,7)-30	62,9	117,2	44,4	100,2	62,2	102,7	61,8	100,0	-60,6
PE (9,9/9,7)-15	64,4	115,6	44,9	94,2	63,5	96,8	63,3	97,1	-53,0
PE (9,7)	65,6	121,0	50,1	103,5	64,9	107,2	64,9	105,7	-49,6



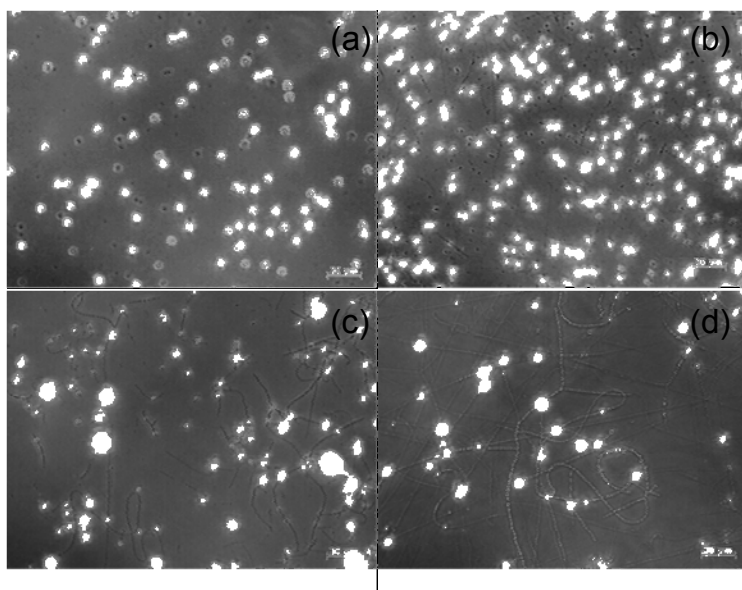
### 6.3. Electrospinning de poli(GLC-AMH)

Para el electrospinning del poli(GLC-AMH) se prepararon diferentes disoluciones de la poliesteramida en el solvente HFIP (hexafluoroisopropanol): 10%, 20%, 30% y 35%-*p/v*. En todos los casos, la disolución de polímero fue aplicada al campo eléctrico usando una aguja 18G (sin bisel o roma; diámetro interno 0.83 mm), y la distancia aguja colector fue de 25 cm. El parámetro operacional del flujo fue variable en el rango de 0.5-2 mL/h, y el voltaje fue variable entre 12-30 kV. Todas las muestras del electrospinning fueron inmediatamente evaluadas por microscopía óptica.

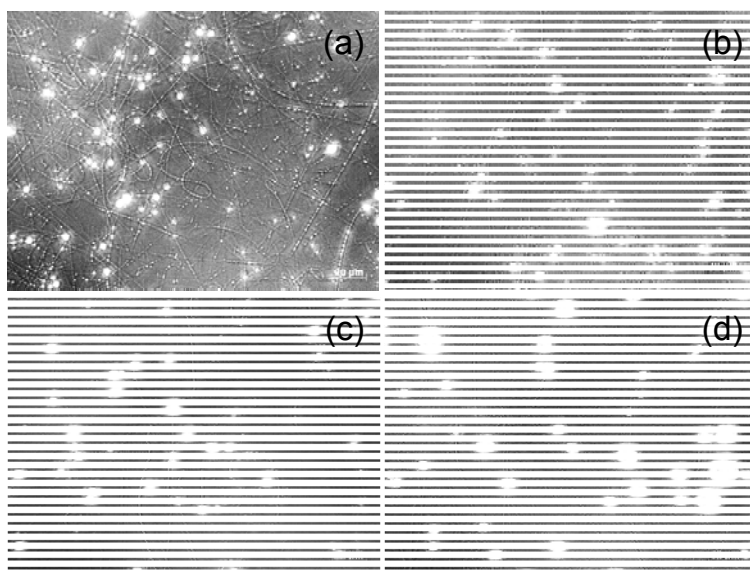
En la Figura 6.12 se muestra el efecto de la concentración de poli(GLC-AMH) en el proceso de electrospinning. La concentración de la disolución de poli(GLC-AMH) fue el principal factor que afecta el proceso de electrospinning del polímero. Así, con la disolución de poli(GLC-AMH) al 10%-*p/v* en todas las condiciones ensayadas se obtuvieron pequeñas partículas de polímero a manera de gotas (electrospray) y que fueron observadas como partículas birrefringentes a la microscopía óptica (Fig 6.12a). La concentración de 20%-*p/v* de poli(GLC-AMH) permite obtener pequeñas fibras cortas (a manera de agujas) conjuntamente con partículas de polímero, y los cambios de flujo y voltaje en los rangos ensayados no permitieron obtener una situación de predominio de las fibras sobre las partículas (Fig 6.12b). Sin embargo, el electrospinning de disoluciones del 30% y 35%-*p/v* de poli(GLC-AMH) en HFIP permitió obtener nanofibras. Con la disolución del 30 %-*p/v* de poli(GLC-AMH) se obtuvieron fibras cortas y largas, y en ambos casos las fibras contenían beads como defectos (Fig 6.12c). Finalmente, la morfología de las fibras obtenidas con la disolución de poli(GLC-AMH) al 35 %-*p/v* mejora porque predominan las fibras de mayor longitud, aunque continúan mostrando los bead como defectos (Fig. 6.12d).

Así, la disolución de poli (GLC-AMH) al 35%-*p/v* fue procesada para ser optimizada por el flujo de la disolución durante el electrospinning. Para ello, se ensayaron flujos en el rango de 0.2 a 2 mL/h manteniendo fija la distancia aguja –colector en 25 cm y el potencial del campo eléctrico en 30 kV (Fig. 6.13). Los resultados mostraron la disminución de los beads en las fibras conforme se incrementa el flujo de la disolución entre 1-2 mL/h.

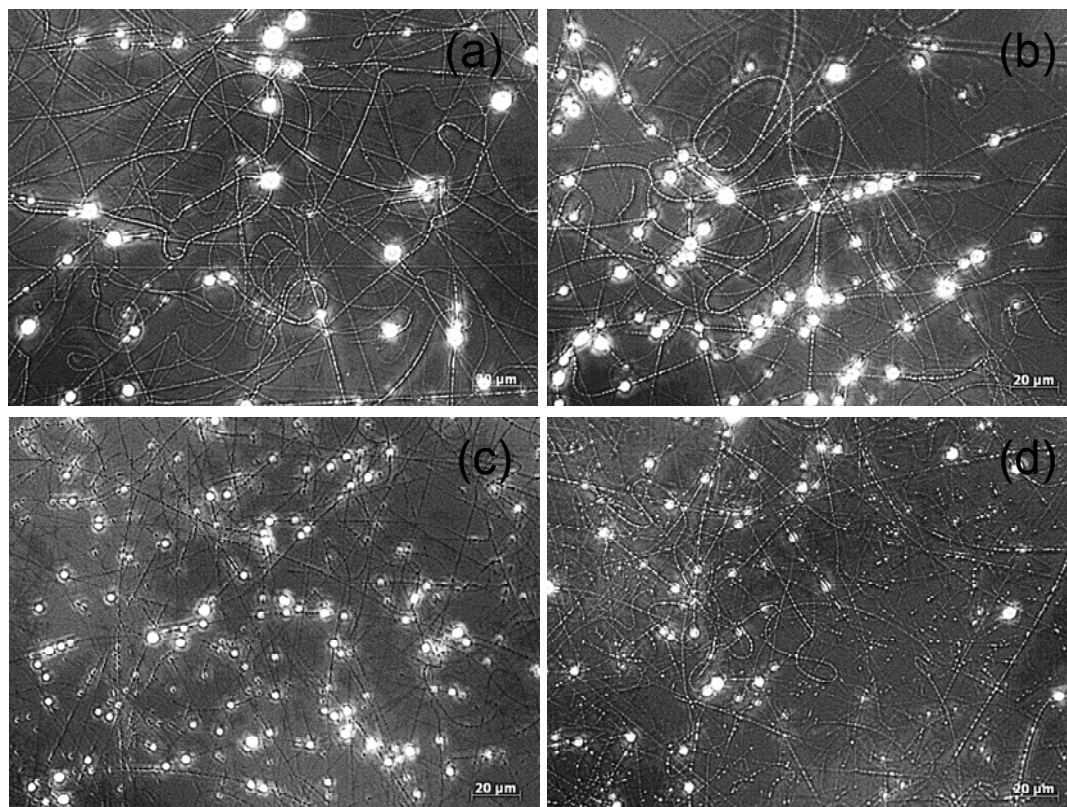
El parámetro de campo eléctrico también fue optimizado para el electrospinning del poli (GLC-AMH). Para ello, se fijó el flujo de la disolución de polímero en 0.2 mL/h y la distancia aguja-colector a 25 cm. Campos eléctricos de diferente voltajes en el rango de 18 a 30 kV fueron aplicados durante el electrospinning. Los resultados obtenidos son mostrados en la Fig. 6.14, donde claramente se observa que a flujos lentos y bajos voltajes el tamaño de los beads en las fibras se incrementa. Por lo contrario, a flujos lentos y altos voltajes el tamaño de los beads en las fibras disminuye.



**Figura 6.12.** Imágenes de microscopía óptica que muestran el efecto de la concentración de poli(GLC-AMH) en el proceso de electrospinning. Disoluciones de 10% (a), 20% (b), 30% (c) y 35%-*p/v* (d) de poli(GLC-AMH) en HFIP. Las muestras fueron electrospineadas a 25 cm (distancia aguja-colector), 1 ml/h y 20 kV



**Figura 6.13.** Efecto del flujo en la optimización del electrospinning de poli(GLC-AMH). Disolución de la poliesteramida al 35%-*p/v* en HFIP fueron electrospineadas a 25 cm de distancia aguja-colector y 30 kV. Los flujos fueron variables: a) 0.2, b) 0.5, c) 1, y d) 2 mL/h.



**Figura 6.14.** Efecto del voltaje en la optimización del electrospinning del poli(GLC-AMH). El electrospinning de las disoluciones del polímero al 35%-*p/v* en HFIP fue realizado a 25 cm de distancia aguja-colector y a flujo de 0.2 mL/h. El voltaje fue variable: a) 18, b) 20, c) 25, y d) 30 kV.

## 6.4. Electrospinning de los poliésteres (PE)

Para el electrospinning de los poliésteres estudiados se electrospinearon previamente los PE puros basados en el ácido pimélico y azelaico, PE (9,7) y PE (9,9) respectivamente. Así, su comportamiento durante el electrospinning fue utilizado como y definir así el punto de referencia de las condiciones óptimas para el electrospinning de las mezclas al 85%, 70%, 50% y 15% de PE (9,9) sobre PE (9,7) (ver la Tabla 6.5 para la denominación de estos copolímeros).

### 6.4.1. Electrospinning del PE (9,9)

Para el electrospinning del PE (9,9) se prepararon diferentes disoluciones del polímero en los solventes HFIP: 5% y 10%-*p/v* y en una mezcla de  $\text{CHCl}_3$  y  $\text{HCOOH}$  en las proporciones:

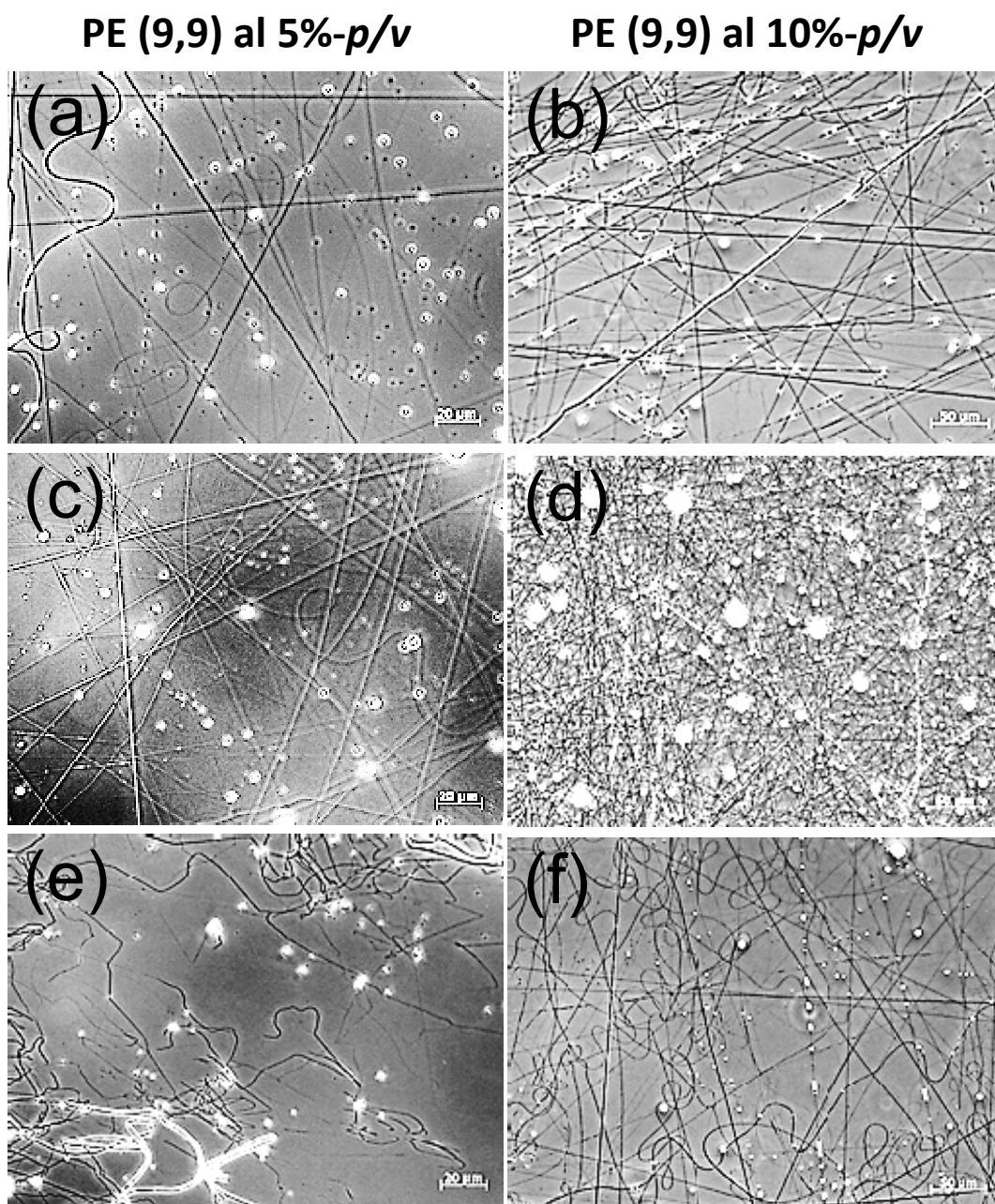
1:0, 2,6:1 y 4:1 (v/v). En todos los casos, la disolución de polímero fue aplicada al campo eléctrico usando una aguja 18G sin bisel, y la distancia aguja-colector variable, y que afecta al tipo de fibras obtenidas, como se muestra en el resumen del efecto producido por la distancia aguja-colector más adelante. El parámetro operacional del flujo fue variable en el rango de 0,5-5 mL/h, y el voltaje también variable entre 10-30 kV. Todas las muestras electrospineadas fueron inmediatamente evaluadas por microscopia óptica y las mejores mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

En primer lugar, se valora el mejor solvente para realizar el estudio del comportamiento del electrohilado, se utilizó HFIP dado que ha sido el mismo solvente usado para el poli(GLC-AMH). El muestreo se inicia con disoluciones al 5% y al 10%-p/v de PE (9,9) en HFIP (Figura 6.15). El electrospinning realizado con campo eléctrico fijo en 30 kV en diferentes condiciones de flujo y distancia aguja-colector mostró mejores resultados en la calidad de las fibras cuando ellas fueron realizadas con la disolución de PE (9,9) al 10%-p/v. Las fibras a 0.5 y 1 mL/h a distancia de 15 cm mostraron una adecuada evaporación del HFIP con el resultado de fibras rectas pero con pequeños beads que se observan como granos birrefringentes dentro de las fibras (Fig. 6.7, b y d). Sin embargo, para esta concentración a bajo flujo de 0.5 mL/h y distancia de 25 cm se observaron fibras de aspecto sinuoso y helicoidal (Fig 6.7 f). Las condiciones más desfavorables para formar fibras fueron obtenidas con la disolución de PE (9,9) al 5%-p/v a 0.5 mL/h y 25 cm de distancia al colector (Fig. 6.7e). En este caso se observan claramente las fibras con una morfología sinuosa, totalmente irregular y particularmente destaca la falta de continuidad en las fibras formadas

Las muestras recogidas de todos los ensayos de electrospinning realizados con las disoluciones de PE (9,9) en HFIP, mostraron malas condiciones para obtener electrofibras de buena calidad. Por esta razón, se diseñó un nuevo estudio de electrospinning preparando disoluciones del PE (9,9) al 10%-p/v en cloroformo y en la mezcla cloroformo-acetona ( $\text{CHCl}_3$ :  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) con diferentes ratios de volumen. Como se observa en la Figura 6.16, cuyas muestras comparten condiciones de distancia aguja-colector de 12,5 cm y voltaje 25 kV, el efecto del solvente tiene un gran importancia en la calidad de las fibras, siendo los solventes utilizados el principal punto de partida a la hora de iniciar el proceso de electrospinning del polímero. Así, con la disolución de PE (9,9) al 10%-p/v en  $\text{CHCl}_3$  apreciamos la formación de esferas de polímero acumuladas, que nos indica la mala calidad del  $\text{CHCl}_3$  como solvente del PE (9,9) a la hora de electrospinearlo, Figura 6.8a, comparativamente las muestras de la Figura 6.8b y c) con a) presentan una gran mejoría al añadir una cantidad de  $\text{HCOOH}$ , y mejorando más si cabe cuanto mayor es la proporción de  $\text{HCOOH}$  en la mezcla del solvente. En estos casos el flujo utilizado no es el mismo en las tres muestras, ya que gracias a la experiencia adquirida existe una relación tipo de solvente/flujo, que descarta algunos regímenes de flujo no útiles en los que se trata de evitar



el goteo por exceso de flujo o cortes en el electrospinning por falta del mismo, los flujos utilizados fueron: a) 5 mL/h, b) 2 mL/h y c) 4 mL/h.



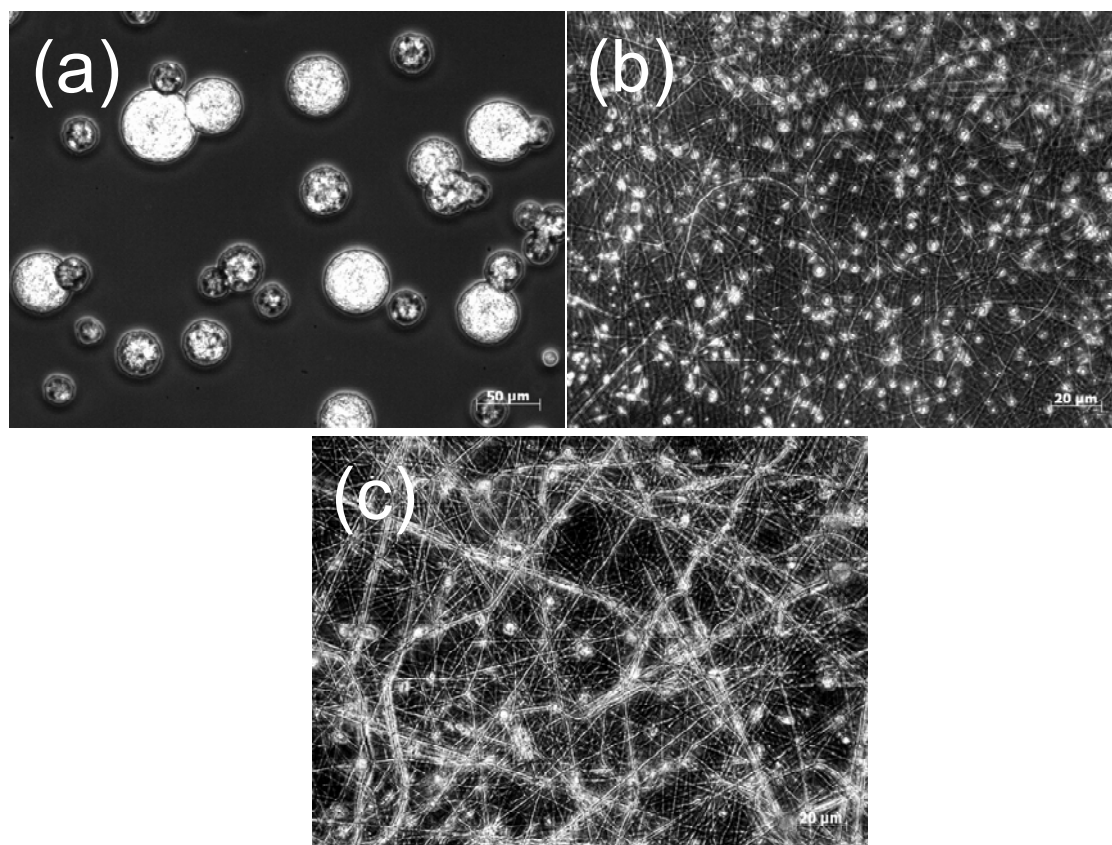
**Figura 6.15.** Efecto de la concentración de PE (9,9) en el electrospinning. Las disoluciones al 5% y 10%-p/v de polímero en HFIP fueron electrospineadas en diferentes condiciones de voltaje, flujo y distancia aguja-colector: a y b) 30 kV, 0,5 mL/h y 15 cm; c y d) 30 kV, 1 mL/h y 15 cm; e y f) 30 kV, 0,5 mL/h y 22,5 cm.

Con estos datos son con los que se toman la decisión de fortalecer y ampliar el estudio centrando los esfuerzos en muestras cuyo solvente a utilizar es una mezcla de  $\text{CHCl}_3$  y  $\text{CHOOH}$  en una relación 2,6 a 1 en volumen. Asimismo, y viendo las condiciones anteriormente descritas se fija un flujo de 4mL/h como flujo óptimo de electroespineado ya que en el barrido de diversos flujos, este valor es el que mejor forma el cono de Taylor, en regímenes de voltajes altos, entre 25 y 30 kV (Tabla 6.5).

De esta disolución entonces, se estudia el efecto de las distancia aguja-colector ya que los otros tres parámetros flujo, concentración, voltaje y concentración de la disolución así como el disolvente a escoger han quedado fijados (ver Figura 6.17). Claramente, se observó que la formación de electrofibras en el rango de voltaje de 25-30 kV fue muy similar. Sin embargo a distancias cortas entre la aguja y colector se observaron beads, los cuales disminuyen al aumentar la distancia aguja-colector. Así, se observaron dos condiciones aparentemente semejantes para obtener electrofibras de buena calidad, tales casos correspondieron a una distancia de 17.5 cm y voltaje de 30 kV (Figura 6.9f), y a mayor distancia de 22.5 cm y menor voltaje como 25 kV (Figura 6.9g).

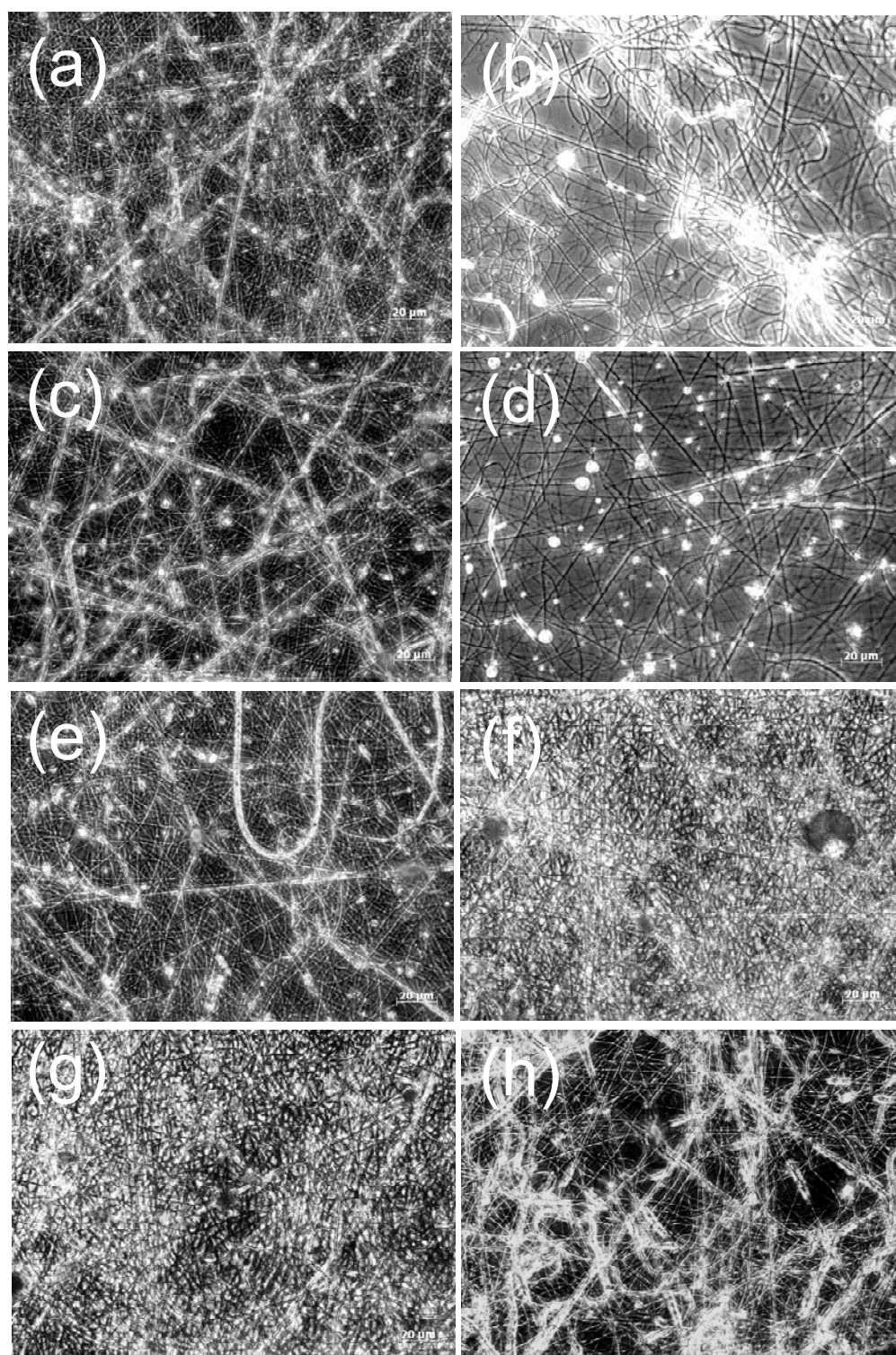
**Tabla 6.5.** Diseño para estudiar el efecto de la distancia y voltaje en la disolución de PE (9,9) al 10%-p/v en la mezcla  $\text{CHCl}_3$ : $\text{CHOOH}$  en una relación 2,6:1-v/v.

Distancia (cm)	Flujo (mL/h)	Voltaje (kV)	Diámetro (G)
6,5	4	25	18
6,5	4	30	18
12,5	4	25	18
12,5	4	30	18
17,5	4	25	18
17,5	4	30	18
22,5	4	25	18
22,5	4	30	18



**Figura 6.16.** Efecto de los solventes. Disoluciones al 10%-p/v, todas fueron electrospineadas con un voltaje de 25 kV distancia aguja-colector 12,5 cm., flujos según necesidad para evitar goteo y promover la formación del cono de Taylor de 5, 2 y 4 mL/h respectivamente y como variables de estudio a) solvente  $\text{CHCl}_3$  b) mezcla de solventes  $\text{CHCl}_3$ : $\text{CHOOC}$  en una relación 4:1-v/v y c) mezcla de solventes  $\text{CHCl}_3$ : $\text{CHOOC}$  en una relación 2,6:1-v/v.





**Figura 6.17.** Efecto de la distancia aguja-colector. En todos los casos el flujo fue fijo a 4mL/h. La distancia y voltaje fueron: a) 6.5 cm y 25 kV, b) 6.5 cm y 30 kV, c) 12.5 cm y 25 kV, d) 12.5 cm y 30 kV, e) 17.5 cm y 25 kV, f) 17.5 cm y 30 kV, g) 22.5 cm y 20 kV, y h) 22.5 cm y 30 kV.

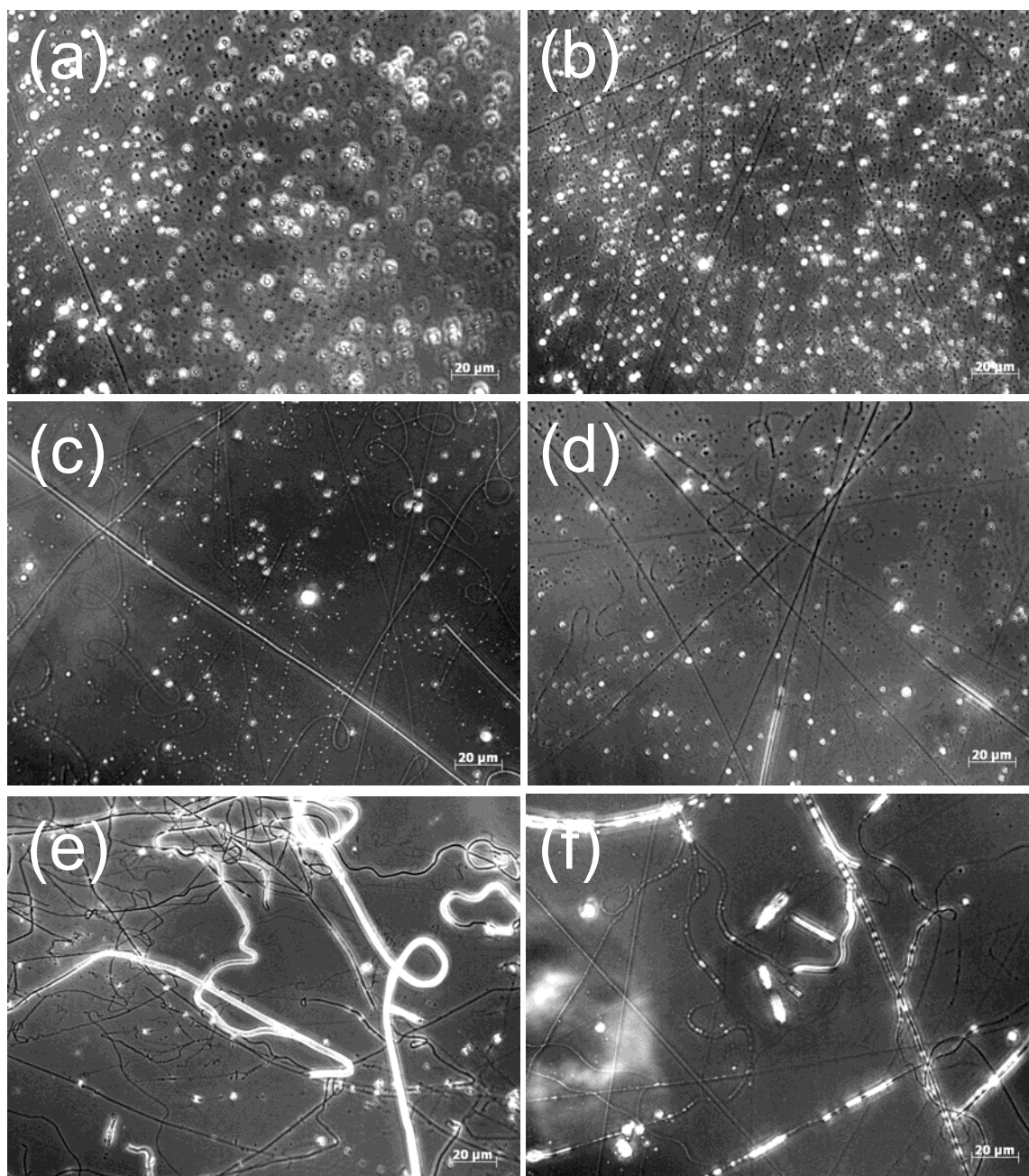


#### 6.4.2. Electrospinning del PE (9,7)

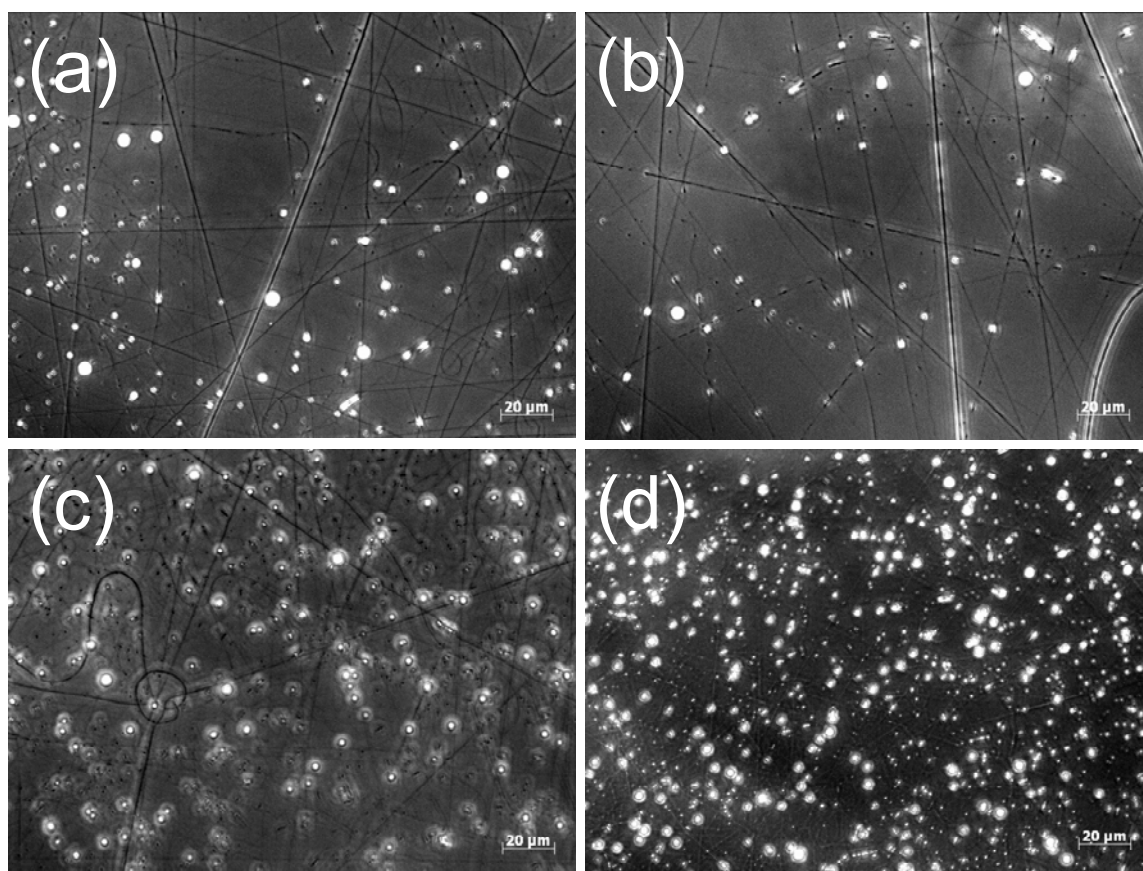
Para la elaboración de fibras del PE (9,7) se parte del conocimiento que éstas pueden ser difícilmente obtenidas debido al bajo peso molecular del polímero. Sin embargo, se decide estudiar su electrohilado a partir de las condiciones similares a las estudiadas con el PE (9,9) usando los mismos solventes para el estudio y condiciones relacionadas con el proceso de electrospinning, tal como, distancia aguja-colector, voltaje, flujo, y concentración del poliéster en disolución.

Se inicia el experimento con unas concentraciones del poliéster a una concentración al 10%-*p/v* en HFIP y se fija una distancia agua-colector de 15 cm, como parámetros constantes inicialmente y extraídos de las mejores condiciones del experimento con el PE (9,9). En la misma línea los voltajes que se van a aplicar van a estar por encima de los 20kV. En la Figura 6.18 se muestra la importancia del flujo y como mejora la producción y la calidad de las fibras a medida que este es más bajo, a flujos altos prevalece la formación de goteos y a medida que este se reduce mejora la calidad de la fibra sin ser una fibra homogénea y de una calidad suficiente.

Es ampliamente conocido que la viscosidad de la disolución es un punto crucial para obtener electrofibras. Así, para incrementar la viscosidad de un polímero de bajo peso molecular se puede intentar incrementar la concentración de la disolución. En esta dirección, se realizó el electrospinning del PE (9,7) en concentración del 20%-*p/v* en HFIP, con flujos comprendidos entre los 0,5 y 1 mL/h, suficientes para evitar el goteo y para favorecer la formación del cono de Taylor. Los resultados para estas muestras se observan en la Figura 6.19. Así, en el flujo de 1 mL/h y con campos eléctricos de voltajes de 25 y 30 kV se observa la formación de gotas (Figura 6.19c y d), lo cual indica que para estas condiciones de electrospinning la disolución del PE (9,7) no tiene suficiente viscosidad para que la gota del polímero en disolución forme el cono de Taylor. Por lo contrario, cuando el flujo disminuye a 0.5 mL/h se observó la formación de algunas fibras (Figura 6.19a y b) lo cual indica que el tiempo de permanencia de la gota del polímero en la punta del tip o aguja es un factor importante que se complementa con la concentración del polímero en disolución.



**Figura 6.18.** Electrospinning de muestras de PE (9,7) al 10%-p/v en HFIP, con distancia aguja-colector de 15 cm. a) Flujo 1 mL/h y voltaje de 25 kV, b) flujo 1 mL/h y voltaje de 30 kV, c) flujo 0,5 mL/h y voltaje de 25 kV, d) flujo 0,5 mL/h y voltaje de 30 kV, f) flujo 0,2 mL/h y voltaje de 25 kV y g) flujo 0,2 mL/h y voltaje de 30 kV.



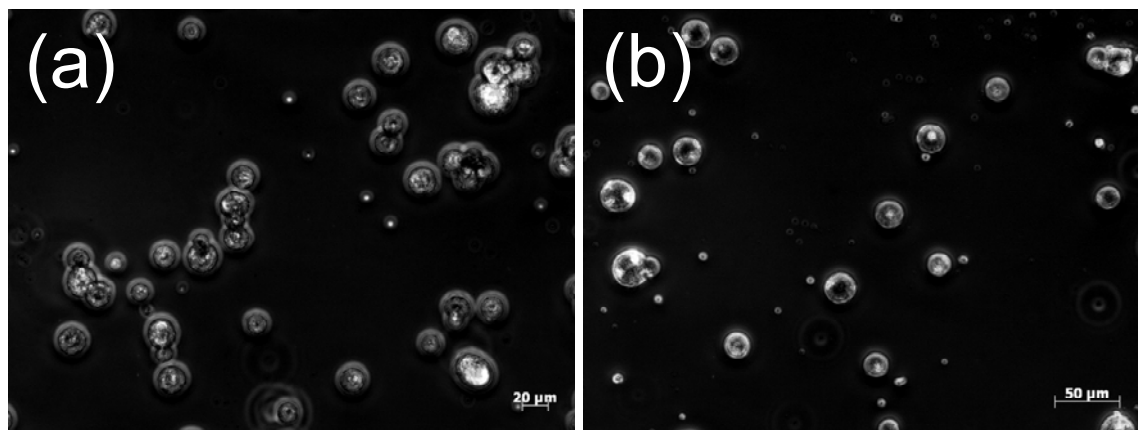
**Figura 6.19.** Electrospinning de muestras de PE (9,7) al 20%-*p/v* en HFIP, con distancia aguja-colector de 15 cm. a) Flujo 0,5 mL/h y voltaje de 25 kV, b) flujo 0,5 mL/h y voltaje de 30 kV, c) flujo 1 mL/h y voltaje de 25 kV, y d) flujo 1 mL/h y voltaje de 30 kV.

En todas las situaciones estudiadas se observó que existe una tendencia del polímero a formar fibras pero con una frecuente presencia de gotas en todas las muestras recogidas (Figura 6.18 y 6.19).

Finalmente y en sintonía con los ensayos realizados para el PE (9,9). Se prepararon disoluciones del PE (9,7) en un disolvente preparado por una mezcla de  $\text{CHCl}_3$  y  $\text{HCOOH}$ . Estos resultados se muestran en la Figura 6.20. El PE (9,7) disuelto en una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ : $\text{HCOOH}$  en una relación 2:1 *v/v* puede ser desestimada como una buena disolución para obtener fibras por electrohilado. Como se puede observar en la Figura 6.20a y b, a partir



de la disolución de PE (9,7) al 10%-p/v se obtuvieron gotas de polímeros durante el electrospinning.



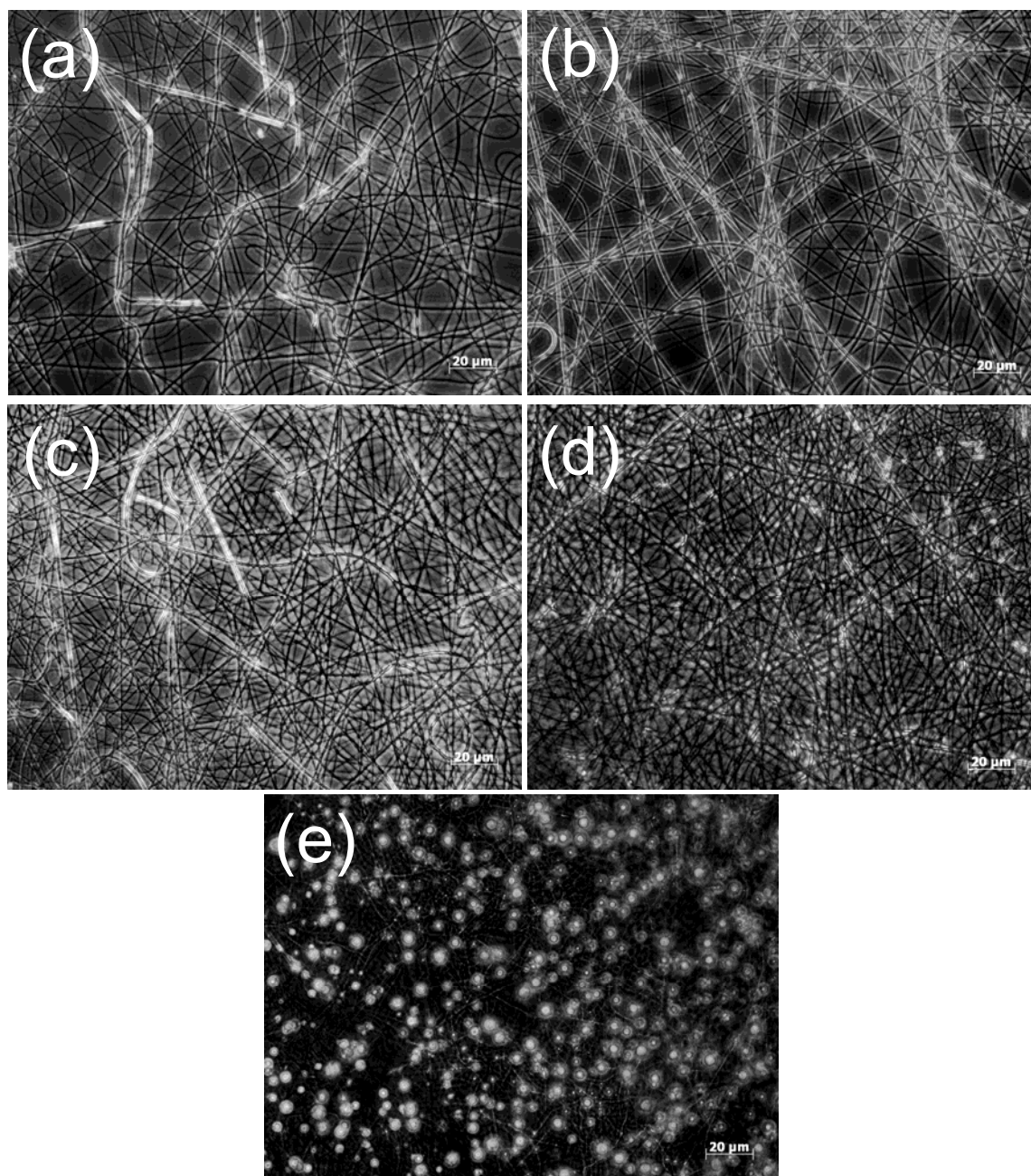
**Figura 6.20.** Electrospinning de muestras de PE (9,7) al 10%-p/v en mezcla de solventes  $\text{CHCl}_3$ : $\text{CHOO}$  en una relación 2:1-v/v, con distancia aguja-colector de 15 cm flujo 5 mL/h y a) voltaje de 20 kV y b) voltaje de 30 kV.

## 6.5. Caracterización morfológica de las fibras de PE (9,9) y los copolímeros PE (9,9/9,7)

Después del estudio de microscopia óptica donde se observó la posibilidad de preparar electrofibras del PE (9,9) y no poder preparar electrofibras del PE (9,7). Se decidió preparar electrofibras del PE (9,9) y mezclas del PE (9,9) y el PE (9,7) en diferentes proporciones. La posibilidad de obtener fibras desde las mezclas de ambos poliésteres es fundamentada en el hecho que el PE (9,9) debe aportar las características necesarias para mantener fibras estructuradas con el aporte de las características del PE (9,7).

Para designar las mezclas de los PE (9,9) y PE (9,7) se ha usado la siguiente abreviatura PE (9,9/9,7)-x%; donde x% corresponde a la composición en porcentaje del PE (9,9). Así, se han preparado las mezclas PE (9,9/9,7)-85%, PE (9,9/9,7)-70%, PE (9,9/9,7)-50% y PE (9,9/9,7)-15%. Las diferentes disoluciones del PE (9,9) y de las mezclas PE (9,9/9,7)-x% fueron preparados al 10%-p/v en una mezcla de disolventes de cloroformo-acetona 2.6:1 v/v. Los mejores resultados fueron conseguidos con las siguientes condiciones: Para el PE (9,9) puro una distancia aguja colector de 22.5 cm, flujo de 4 mL/h y voltaje de 25 kV. Para las

mezclas, todas fueron preparadas en distancia aguja-colector de 12.5 cm, flujo de 2 mL/h y voltaje de 20-30 kV.

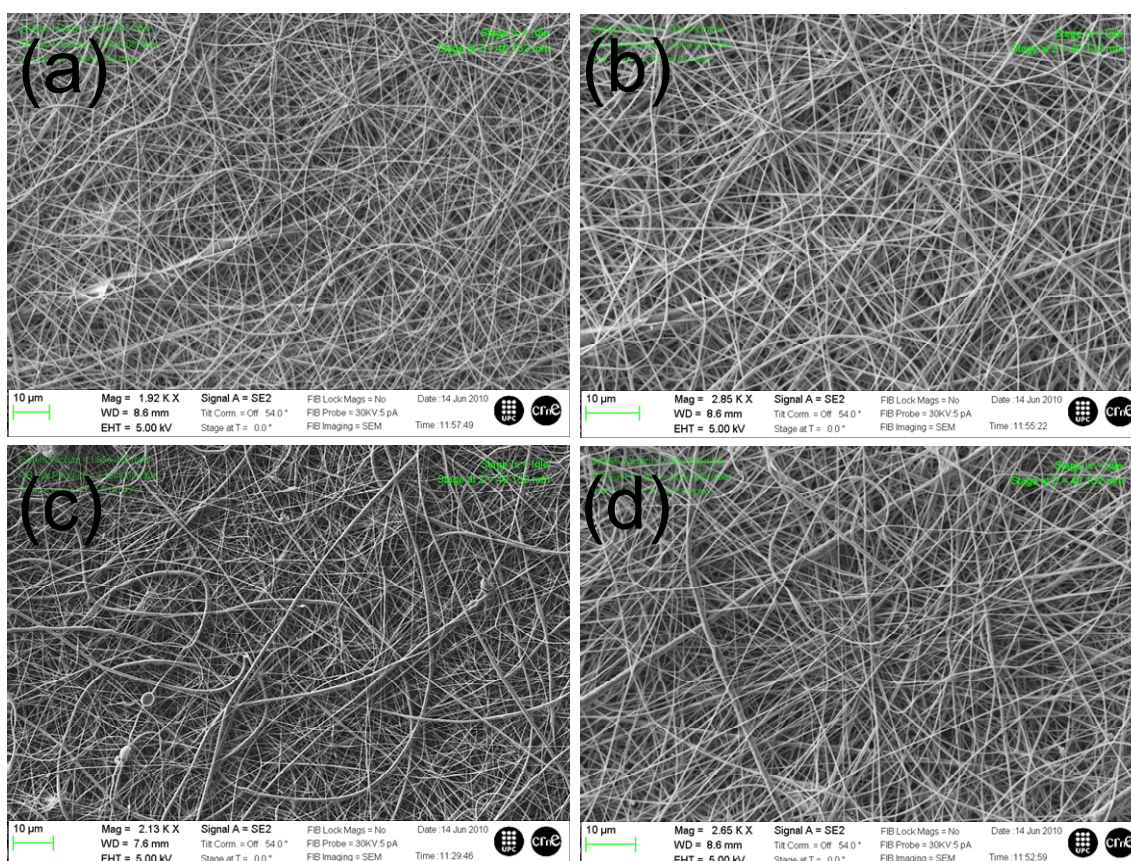


**Figura 6.21.** Imágenes de microscopía óptica de las fibras del PE (9,9) y de las mezclas de PE (9,9/9,7). a) PE (9,9), b) PE (9,9/9,7)-85%, c) PE (9,9/9,7)-70%, d) PE (9,9/9,7)-50%, e) PE (9,9/9,7)-15%.



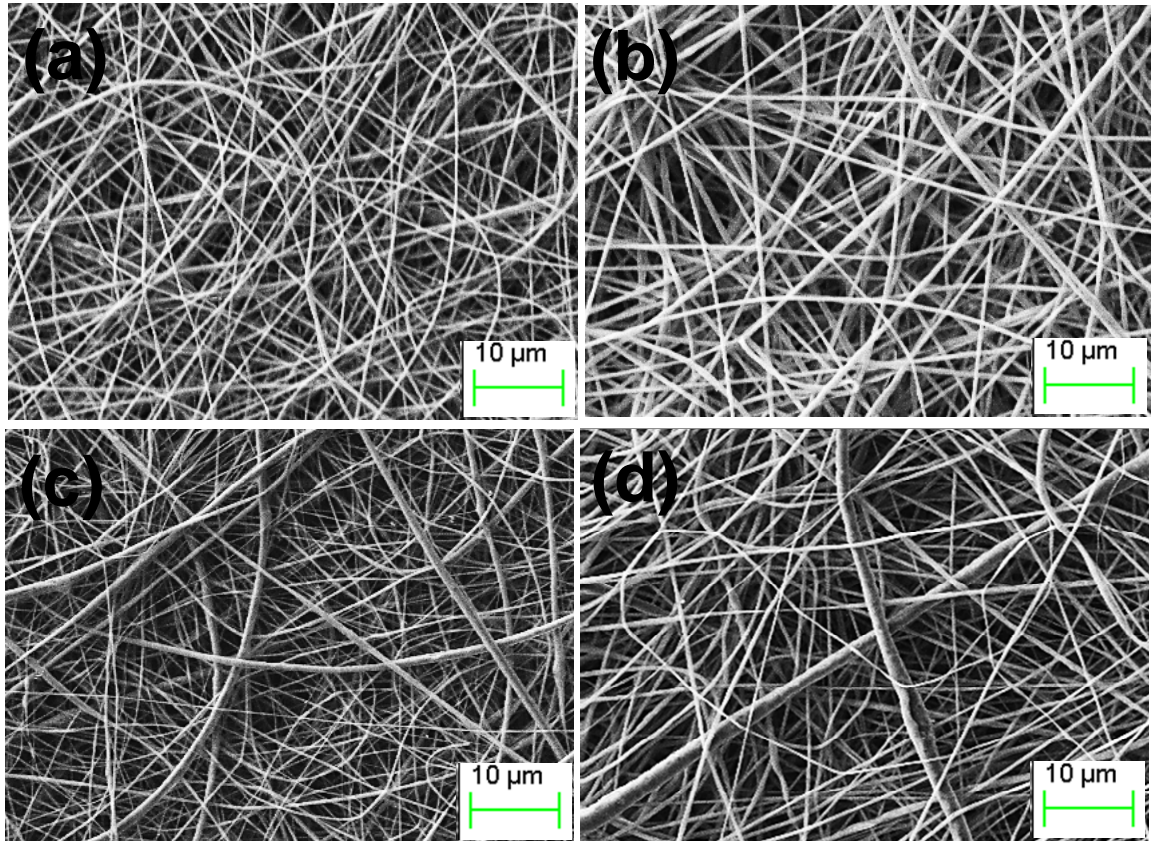
Otros disolventes probados para preparar las disoluciones fueron el HFIP, cloroformo:acetona (2:1 v/v). Finalmente, se seleccionó el cloroformo:acetona (2.6:1 v/v) porque permite obtener las fibras para las mezclas en las condiciones más similares para todas ellas.

Los resultados observados en la Figura 6.21 muestran que las mezclas hasta la composición de 50 %-p/p de PE (9,9) y PE (9,7) fueron disoluciones capaces de producir fibras. Cuando la proporción del PE (9,7) superó el 50%, por ejemplo, la mezcla PE (9,9/9,7)-15% la disolución de esta mezcla produjo matrices con mezcla de gotas y fibras (Figura 6.21e), lo cual indicaría un gran predominio de las propiedades no electrohilables del PE (9,7) sobre el PE (9,9). Finalmente, se realizaron imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las matrices de PE (9,9) y de las mezclas de PE (9,9/9,7)-85%, PE (9,9/9,7)-70%, y PE (9,9/9,7)-50% (Figura 6.22). Estas imágenes SEM permiten caracterizar la morfología de las matrices y las fibras que componen estas matrices. Las matrices se pueden observar homogéneas con fibras bien formadas y regulares.



**Figura 6.22.** Imágenes SEM a menor aumento de las fibras de poliésteres y sus mezclas obtenidas por electrospinning en las condiciones optimizadas. a) PE (9,9); b) PE (9,9/9,7)-85%; c) PE (9,9/9,7)-70%; y d) PE (9,9/9,7)-50%.

Las imágenes SEM a mayor aumento permiten observar que morfológicamente las fibras son de escala nanométrica y aparentemente tiene una morfología suave y lisa (Figura 6.23).

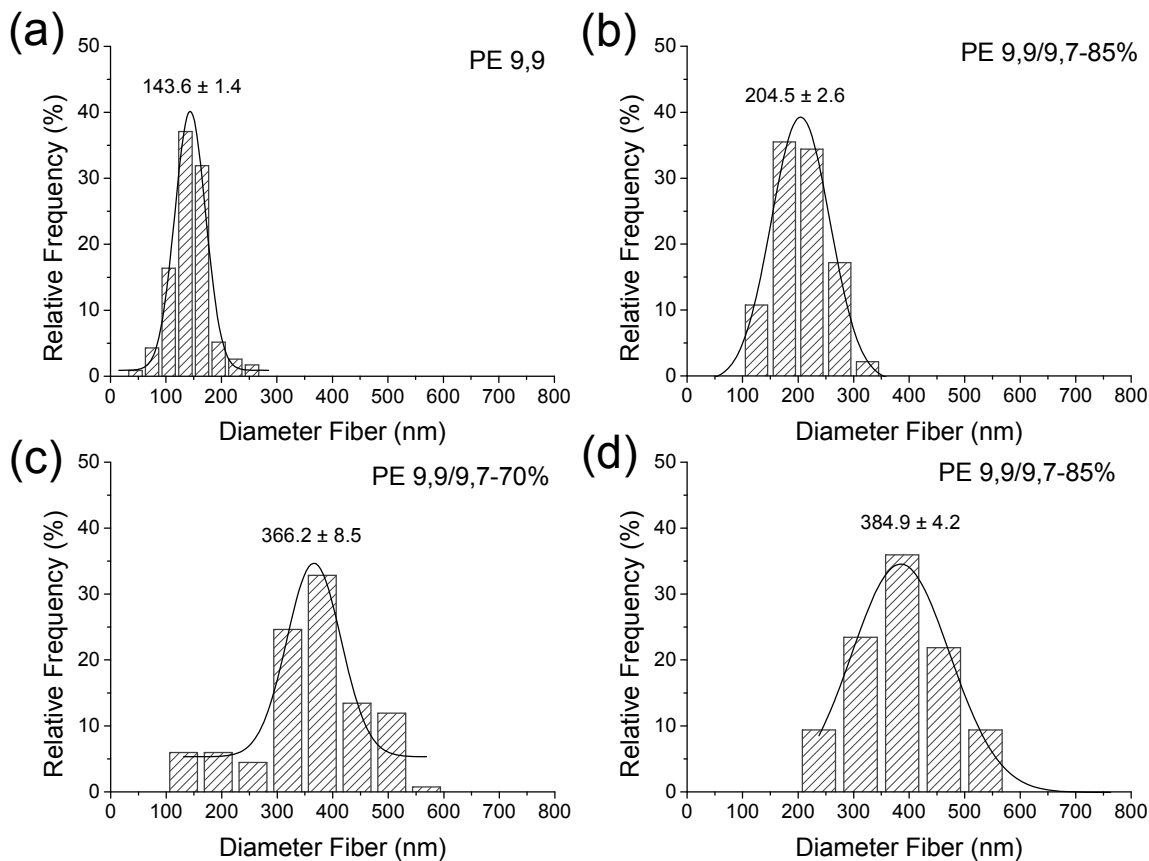


**Figura 6.23.** Imágenes SEM a mayor aumento de las fibras de poliésteres y sus mezclas obtenidas por electrospinning en las condiciones optimizadas. a) PE (9,9) ; b) PE (9,9/9,7)-85%; c) PE (9,9/9,7)-70%; y d) PE (9,9/9,7)-50%.

Un análisis más detallado del diámetro de las fibras de las mezclas de PE (9,9/9,7) se observa en la Figura 6.24. Se muestra que en todas las mezclas se obtuvo una distribución unimodal para la distribución de diámetros. En todos los casos el diámetro de las fibras correspondieron a valores nanométricos. Sin embargo, se puede observar que el diámetro de las fibras se incrementa conforme se incrementa la composición de PE (9,7) en las mezclas. Así, las fibras puras de PE (9,9) muestran un diámetro con valor promedio de 143 nm. Para las fibras de las mezclas PE (9,9/9,7)-85%, PE (9,9/9,7)-70%, y PE (9,9/9,7)-50% mostraron valores promedio de 204 nm, 366 nm y 384 nm, respectivamente (Figura 6.16b-d). Este incremento en el diámetro de las fibras puede estar relacionado al bajo peso molecular



del PE (9,7), lo cual podría permitir un mayor flujo de la gota en el campo eléctrico y ello significa que habría más masa polimérica para obtener las fibras y ello explicaría el incremento de los diámetros.



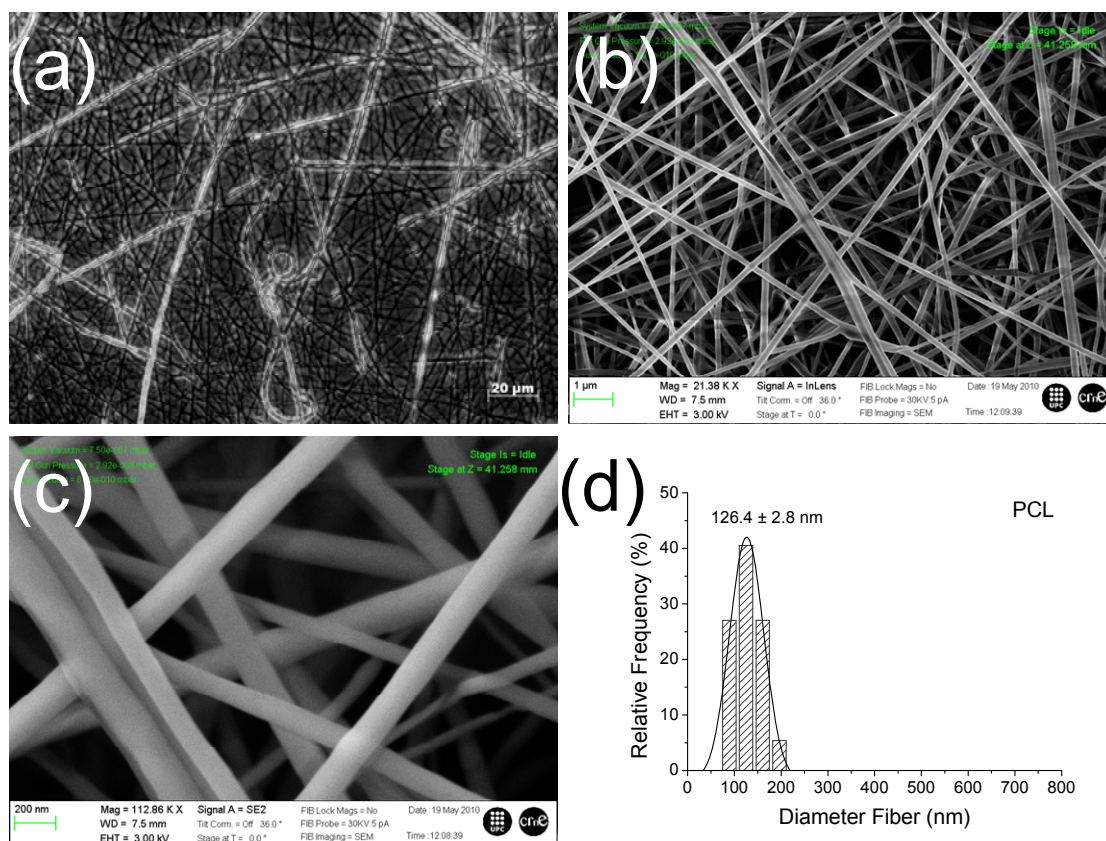
**Figura 6.24.** Distribución de diámetros de las fibras de poliésteres y sus mezclas obtenidas por electrospinning en las condiciones optimizadas. a) PE (9,9); b) PE (9,9/9,7)-85%; c) PE (9,9/9,7)-70%; y d) PE (9,9/9,7)-50%.

## 6.6. Electrospinning de Policaprolactona (PCL)

La policaprolactona (PCL) es un poliéster ampliamente estudiado en procesos de electrospinning. De esta forma el objetivo de introducirla en este trabajo fue como control de los nuevos poliésteres PE (9,9) , PE (9,7) y sus mezclas.



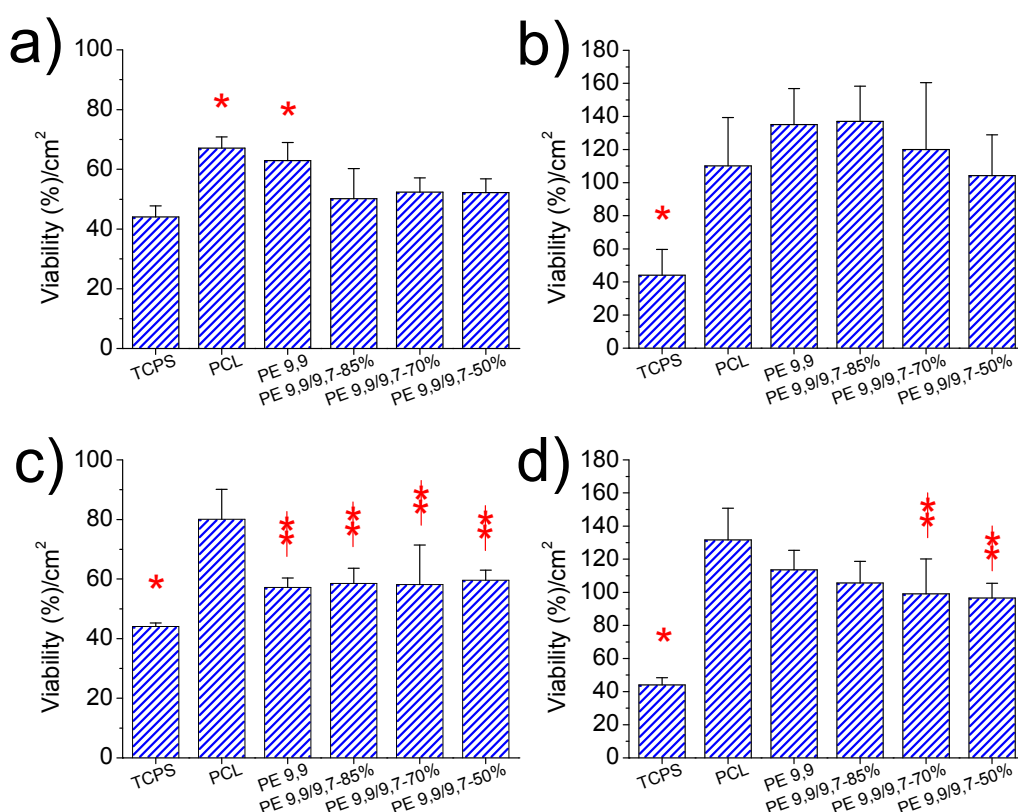
En la Figura 6.25 se muestran diferentes imágenes del procesamiento de la PCL por electrospinning. La PCL fue preparada en disolución en la mezcla de cloroformo: acetona (2.6:1, v/v), la concentración del polímero en la disolución fue del 10%-p/v. La PCL comercial (Sigma-Aldrich) con un peso molecular de 45000 g/mol mostro amplia condiciones para conseguir nanofibras. Así, puede ser procesada a una distancia aguja-colector en el rango de 12.5 a 15 cm, con flujo de la disolución en el rango de 2-5 mL/h y campo eléctrico de 15-30 kV. En la Figura 6.25a-c, se muestran imágenes representativas del proceso de electrohilado de la PCL, concretamente estas nanofibras fueron obtenidas en condiciones de 12.5 cm de distancia aguja-colector, 2 mL/h de flujo y 25 kV. Tanto las microfotografías del microscopio óptico como del SEM a menor aumento muestran que las nanofibras en general son fibras rígidas y de distribución homogénea constituyendo una matriz tridimensional (Figura 6.25a,b). La morfología de las nanofibras (Figura 6.25c) permiten observar que las fibras fueron lisas y la distribución del diámetro de las fibras se observa unimodal con un valor promedio de 126 nm (Figura 6.25d).



**Figura 6.25.** Nanofibras de policaprolactona. a) Imagen de microscopia óptica, b) Imagen SEM a menor aumento, c) Imagen SEM a mayor aumento, y d) Distribución del diámetro de las fibras.

## 6.7. Biocompatibilidad de las matrices de nanofibras

Las matrices de nanofibras del PE (9,9) y de sus copolímeros con PE (9,7) (p.e., PE (9,9/9,7)-x%) fueron estudiadas para demostrar su biocompatibilidad. Para ello, se evaluó la adhesión y proliferación de células epiteliales sobre las matrices de las nanofibras de los poliésteres. Las líneas celulares utilizadas fueron la HEP-2 (células humanas de carcinoma de laringe) y las MDCK (células inmortalizadas de riñón de perro Madin-Darby). Como control se utilizó la propia placa de cultivo (TCPS) y matrices de nanofibras de PCL. La Figura 6.26 muestra los resultados obtenidos para el ensayo de adhesión celular (24 h de cultivo) y para el de proliferación (72 h de cultivo). La adhesión de las células HEP-2 fue significativamente ( $p < 0.05$ ) mayor sobre la matriz del PE (9,9) al igual que la matriz de PCL en comparación al control TCPS (Figura 6.26a). En el caso de las células MDCK, también ocurrió algo similar, observándose que todas las matrices de nanofibras mostraron mejor adhesión que el control de TCPS, pero fueron significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que la adhesión sobre la matriz de PCL (Figura 6.26c).



**Figura 6.26.** Biocompatibilidad de las matrices de PE (9,9) y de las mezclas de PE (9,9/9,7). Adhesión y proliferación de células HEP-2 (a, b) y MDCK (c y d). Los gráficos representan el promedio  $\pm$  SD ( $n=4$ ). Tukey test, \*  $p < 0.05$  vs otras matrices, †  $p < 0.05$  vs matriz de PCL.

Sin embargo, una situación más general fue observada cuando se evalúa la proliferación celular sobre las matrices de nanofibras, como se puede observar en la Figura 6.26 b y d, tanto para células HEp-2 como para las MDCK respectivamente, las matrices de nanofibras fueron capaces de soportar mayor número de células en comparación al control de la placa de cultivo (TCPS). Sin embargo, las células de carcinoma de laringe (HEp-2) sobre las matrices del PE (9,9) y sus mezclas tuvieron en promedio una mayor proliferación (no significativa) en comparación a la PCL (Figura 6.26b). Por lo contrario, las células inmortalizadas (no tumorales) MDCK mostraron menor crecimiento celular sobre las matrices del PE (9,9) y sus mezclas en comparación a la matriz de PCL, llegando a valores significativos en el caso de las mezclas PE (9,9/9,7)-70% y PE (9,9/9,7)-50% (Figura 6.26d).

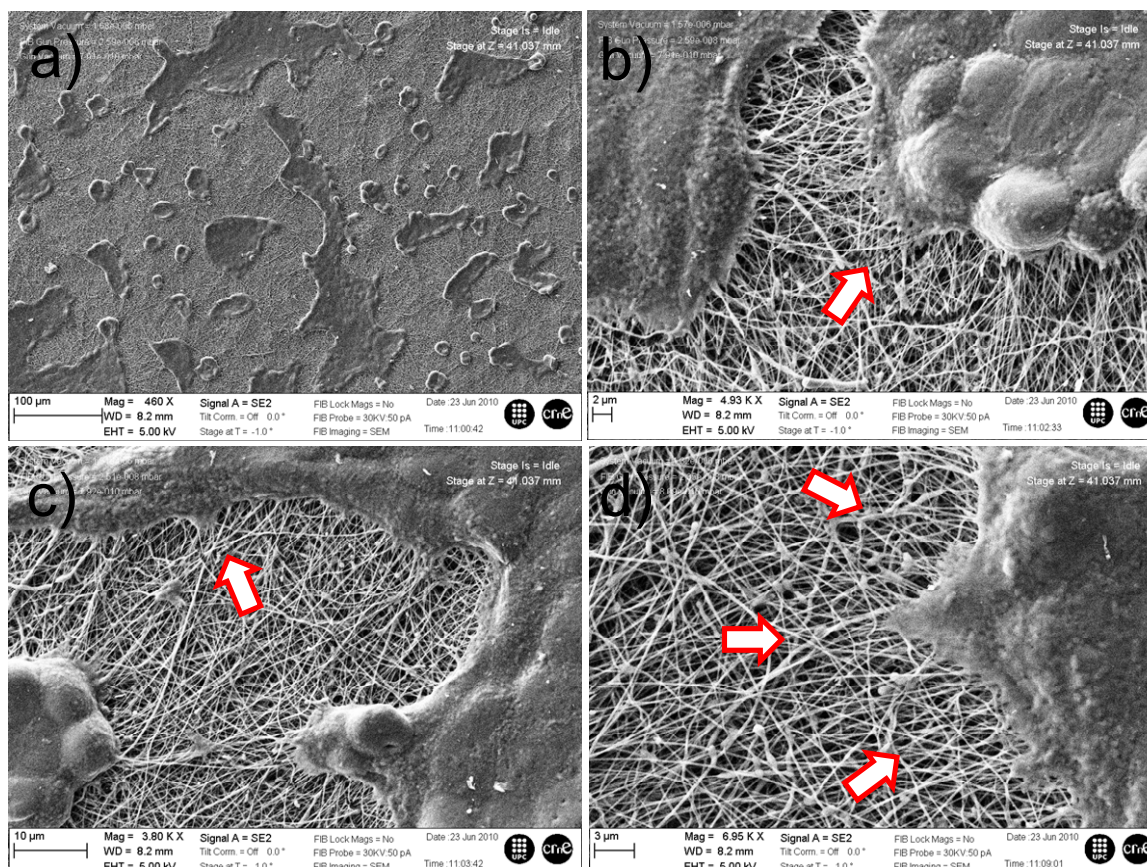
Finalmente, y en general se puede concluir que las matrices de nanofibras del PE (9,9) y sus copolímeros PE (9,9/9,7) fueron plataformas adecuadas para la adhesión y crecimiento celular, y su características de nanofibras permite la interacción célula-material sin evidencia de daño citotóxico. Este hecho es conocido para poliésteres como el poliláctico y policaprolactona [50] y de allí su amplia aplicación como materiales usados para diversas aplicaciones biomédicas incluida la preparación de scaffolds o matrices de fibras.

En particular, para este estudio la PCL fue utilizada como poliéster control y por ello se prepararon matrices de nanofibras. En la Figura 6.27 se puede observar que esta matriz fue capaz de soportar la adhesión celular. En la Figura 6.27a se observan diferentes tamaños de cluster de células adheridas a la matriz de nanofibras. En los cluster de mayor tamaño es fácilmente observado que las células se encuentran extendidas y formando dominios de monocapas. La interacción célula-material ocurre desde fases muy tempranas, puede observarse que células aún redondeadas ya tienen interacción mediante extensiones citoplasmáticas con la matriz de fibras, lo mismo sucede para las células más extendidas (Figura 6.27b-d).

En este mismo sentido, la adhesión sobre las matrices de nanofibras de PE (9,9) ocurre por extensiones celulares sobre la superficie de las fibras (Figura 6.28a y b). La proliferación de las células sobre la matriz termina conformando una monocapa de células (Figura 6.28c) y las extensiones celulares de anclaje a la matriz no solo se restringen a las fibras más superficiales, sino por el contrario estas extensiones invaden el interior de la matriz a través de los poros formados entre las fibras (Figura 6.28d).

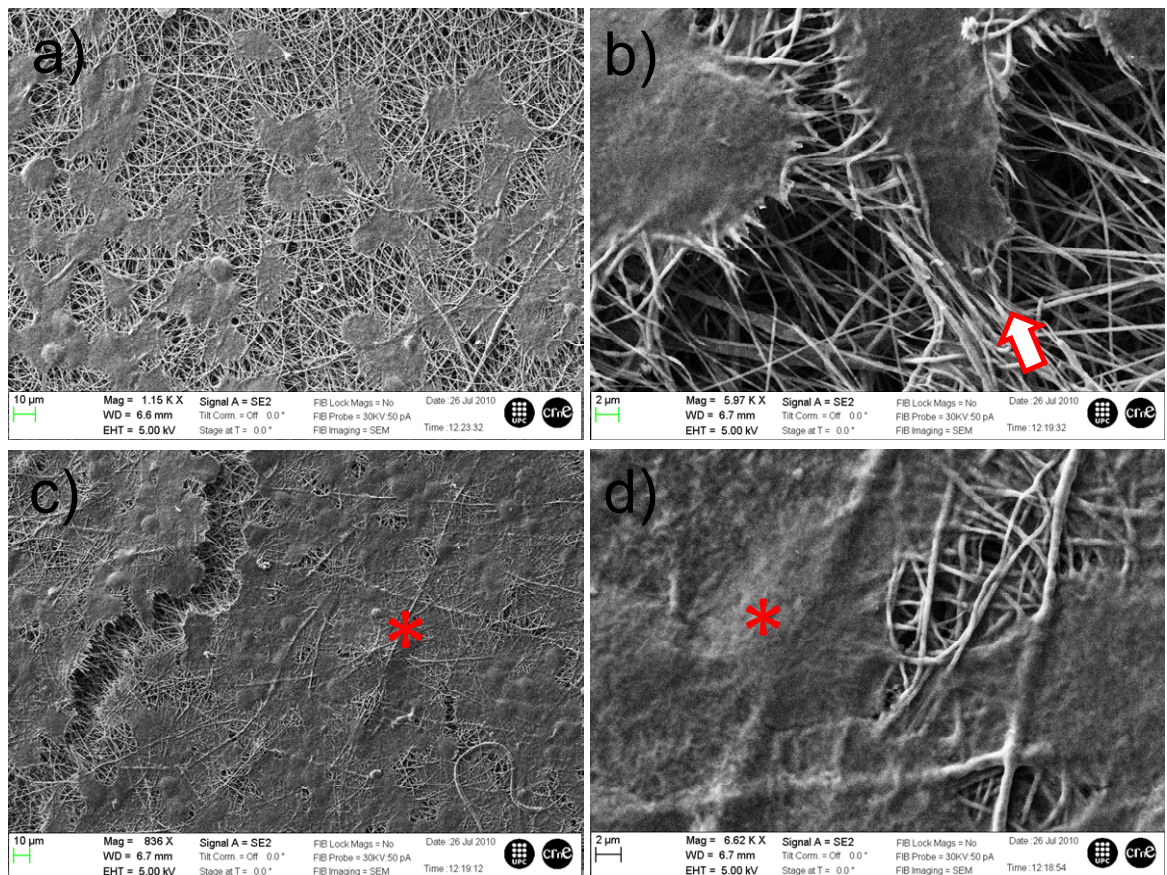
Por otro lado, y aunque algunas diferencias cuantitativas pueden haber sido observadas entre las matrices de los copolímeros de PE (9,9/9,7) y las matrices de PE (9,9) y PCL. Cualitativamente, el proceso de adhesión y proliferación celular ocurren de manera normal sobre las superficies de nanofibras de las matrices de los copolímeros de PE. Como





**Figura 6.27.** Adhesión de células tumorales HEP-2 sobre la matriz de nanofibras de PCL. a) Imagen a menor aumento. b-d) Imágenes a mayor aumento para destacar las interacciones célula-nanofibras (flechas).

ejemplo de ello se muestra la Figura 6.29, donde se observan los procesos de adhesión celular (Figura 6.29a-c) y proliferación celular (Figura 6.29d-f) sobre la matriz de nanofibras del copolímero PE (9,9/9,7)-50%. Inicialmente las células redondeadas se adhieren a las nanofibras iniciándose el primer contacto célula-material (Figura 6.29a), A partir de aquí, la célula aun manteniendo su forma redondeada despliega extensiones de su citoplasma para establecer un contacto íntimo con la superficie (Figura 6.29b), a mayor aumento es claro que esta interacción célula-material en este caso en particular es mediado por la conformación del material como nanofibras porque son las nanofibras las que guían a las extensiones citoplasmáticas para que la célula haga el spreading o extensión sobre la superficie del material (Figura 6.29c). Las células bien extendidas y agrupadas en mayor número inician la formación de la monocapa celular (Figura 6.29d). Las características epiteliales de estas células permite observar una monocapa celular donde las interacciones célula-célula son íntimas y esto va permitiendo que la monocapa pavimente la superficie de la matriz de nanofibras (Figura 6.29e). Un fuerte anclaje de la monocapa de células sobre

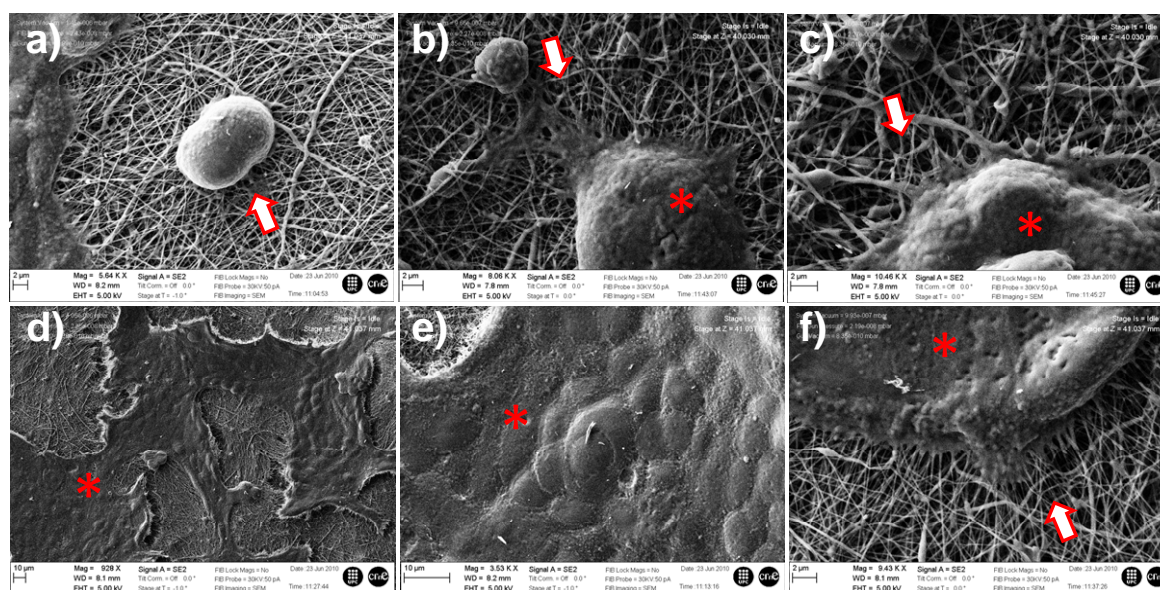


**Figura 6.28.** Adhesión (a-b) y proliferación (c-d) de células HEp-2 sobre las matrices de nanofibras de PE (9,9). La flecha muestra la interacción células-nanofibras, y el asterisco la monocapa celular formada sobre la superficie de la matriz de nanofibras.

la superficie de nanofibras puede ser evidenciado por las numerosas interacciones de las extensiones citoplasmáticas o filopodios sobre las nanofibras (Figura 6.29f).

Finalmente, todo esta dinámica celular de interacción de las células con la superficie de las nanofibras de los PE estudiados, sin duda, alguna sostiene que estos materiales son totalmente biocompatibles y que su conformación tridimensional como scaffold permite una adecuada adhesión de las células para la colonización del material y este hecho podría ser favorecido por la conformación del material como nanofibras que servirían como guías para el spreading o extensión de la célula sobre el material.





**Figura 6.29.** Adhesión (a-c) y proliferación (d-f) de células HEP-2 sobre las matrices de nanofibras del copolímero PE (9,9/9,7)-50%. La flecha muestra la interacción células-nanofibras, y el asterisco la monocapa celular formada sobre la superficie de la matriz de nanofibras.

## 7. Conclusiones

Las principales conclusiones que se han obtenido de la ejecución del presente PFC son:

- 1) Las diferentes disoluciones de poli(GLC-AMH) en el rango de 10-35 %-p/v preparadas en HFIP no originan fibras en diversos protocolos de electrospinning ensayados en este PFC. La imposibilidad de conseguir fibras por electrospinning de la PEA mencionada, hace suponer que el principal problema asociado a este resultado podría ser debido al peso molecular, con lo cual suponemos que poli(GLC-AMH) con peso molecular mayor a 33000 g/mol ( $M_w$ ) y 12000 g/mol ( $M_n$ ) deberían ser preparados para tener una PEA electrohilable.
- 2) El homopolímero basado en el nonanediol y ácido azelaico, PE (9,9) fue electrospineable desde una disolución cloroformo:acetona (2.6:1 v:v) obteniéndose nanofibras. Sin embargo, el homopolímero PE (9,7) basado en el nonanediol y ácido pimélico no pudo ser conformado en electrofibras bajo diferentes condiciones ensayadas. De manera similar a lo anteriormente expuesto para el caso de la PEA, es posible que el bajo peso molecular del PE (9,7) (19000 g/mol y 8000 g/mol,  $M_w$  y  $M_n$  respectivamente) sea la principal causa para no conseguir fibras.
- 3) A pesar de que el homopolímero PE (9,7) no fuera electrospineable, los copolímeros PE (9,9/9,7) fueron electrospineables cuando el componente del ácido azelaico fue mayoritario hasta el 50%, es decir, cuando su contenido fue menor al 50% el copolímero no puede ser electrospineable. Este hecho indicaría que la presencia mayoritaria del PE (9,9) permite obtener nanofibras en estos copolímeros. Esta característica de conformación en electrofibras se pierde cuando comienza a predominar mayoritariamente el PE (9,7) con sus propiedades no electrospineables.
- 4) Finalmente, las matrices de nanofibras del PE (9,9) y de los copolímeros PE (9,9/9,7) con contenido mayoritario de ácido azelaico (100%-50%) demostraron buena biocompatibilidad sin efectos citotóxicos en células inmortalizadas (MDCK) y células tumorales (HEp-2). Estas matrices de nanofibras tienen propiedades para soportar la adhesión y proliferación de células. Este hecho fue comparable a poliésteres comerciales como la policaprolactona. En este sentido, las matrices obtenidas de los PE (9,9) y sus copolímeros PE (9,9/9,7) podrían tener potenciales aplicaciones en el área de la biomedicina e ingeniería de tejidos.

## 8. Estudio de sostenibilidad del PFC

El desarrollo de nuevos materiales poliméricos biodegradables en sí mismo denota sostenibilidad. Basta con considerar que actualmente diversas industrias como la del envasado, embalaje, textil, biomédica, etc., son algunas industrias que promueven el desarrollo y avance de la industria de los polímeros, ya sea por el desarrollo de nuevos polímeros o por la modificación para mejorar las propiedades de polímeros ya existentes.

Los polímeros estudiados en este PFC, son los poliésteres y poliesteramidas, ambos constituyen grupos de polímeros actualmente muy importantes en el ámbito de la ciencia de los materiales debido a sus propiedades biodegradables, las cuales se refieren a su capacidad de degradación por hidrólisis de los enlaces ésteres.

En la actualidad, los polímeros biodegradables ofrecen diversas ventajas para la protección del medioambiente. Las principales ventajas, en clave de estrategia medioambiental, de los polímeros biodegradables con respecto a los plásticos convencionales, se resumen en la Tabla 8.1

**Tabla 8.1.** Comparativa de impacto medioambiental en la fase de producción y en el tratamiento de residuos a partir de plásticos convencionales y biodegradables.

Pásticos convencionales	Plásticos biodegradables
Utilizan como materia prima recursos no renovables	Su producción es sostenible a partir de residuos de la agroindustria
Se acumulan en el ambiente	Se degradan fácilmente por la acción de microorganismos
Su reciclado puede generar sustancias tóxicas	Su biodegradación produce O <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> O

Otro dato importante que hay que destacar con respecto al medio ambiente es que la utilización de polímeros biodegradables presenta menor consumo de energía no renovable con respecto a los plásticos convencionales.

El estudio de sostenibilidad del PFC incluye el impacto ambiental y salud, el impacto social y el impacto económico que se ha generado durante la ejecución del PFC. Los objetivos de este estudio fueron:

- Identificar, describir y valorar los efectos que la realización de este proyecto pueda producir sobre los factores ambientales.



- ii) Explicar el efecto del proyecto a lo largo de su ciclo de vida.
- iii) Evaluar el coste global del proyecto realizando el presupuesto del mismo.

## 8.1. Impacto medioambiental y salud e impacto social.

Para la evaluación del impacto medioambiental y salud (EIAS) se realizó la evaluación del peligro de las sustancias utilizadas en las diferentes fases del proyecto. Con esta finalidad se utilizó la normativa vigente para la Unión Europea (UE) en lo referente al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals, REACH).

El reglamento REACH fue aprobado el 18 de diciembre del 2006 con la denominación *“Reglamento (CE) N°1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo”*. Este Reglamento supone una reforma total del marco legislativo sobre sustancias y mezclas químicas en el Espacio Europeo y su principal objetivo es garantizar un alto nivel de protección para la salud humana y el medio ambiente.

De manera complementaria, dos años más tarde (16 de diciembre de 2008) se aprobó, el *“Reglamento (CE) N° 1272/2008”* que trata sobre la clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures, CLP). Este reglamento adicional ofrece un conjunto de criterios armonizados sobre el peligro de las sustancias químicas. El objetivo general es el de garantizar un nivel elevado de protección de la salud humana y del medio ambiente, identificando todas las propiedades Físicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas de sustancias y mezclas.

En este PFC se ha tenido particular atención en cuanto al manejo de las fichas técnicas de los reactivos químicos que se han utilizado durante su ejecución. En cumplimiento de la normativa se conocen los riesgos de salud y medioambientales que tienen las sustancias que se han utilizado en la realización de este proyecto de investigación. Por ejemplo:

- El ácido pimélico de acuerdo con la Directiva Europea 67/548/CEE se clasifica como una sustancia que: Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias.
- El ácido azeláico, el 1,9-nonanediol y la PCL no están clasificados como peligrosos según la Directiva 67/548/CEE.

Además, se considera el impacto ambiental generado en la síntesis de los polímeros y en los ensayos y pruebas realizados con ellos. Se tienen en cuenta los siguientes conceptos:

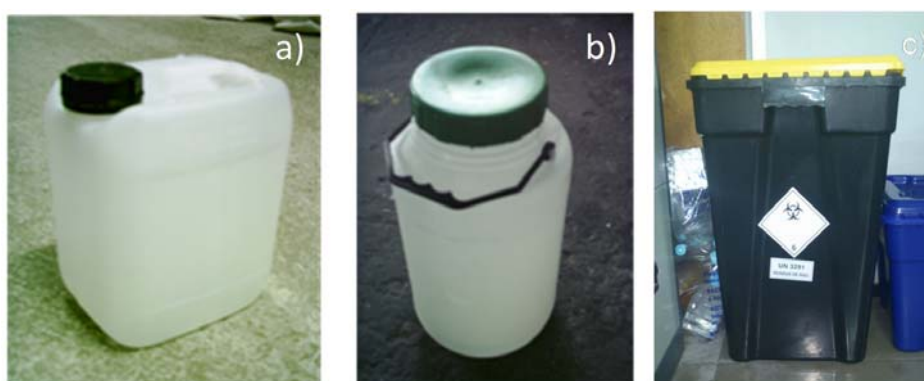
- Emisión de gases: se producen emisiones de gases a la atmósfera a través de las campanas extractoras.
- Eliminación de residuos líquidos: el principal impacto proviene, mayoritariamente, de los disolventes. Son separados en residuos clorados y no clorados, y entregados posteriormente a una empresa que se encarga de su tratamiento.

El impacto medioambiental que pueden tener los scaffolds durante su ciclo de vida es prácticamente insignificante ya que como se ha explicado anteriormente son biodegradables.

En cuanto al impacto social de este PFC si se llevara a cabo en un futuro próximo, cabría tener en cuenta principalmente aquellas personas que puedan necesitar una regeneración sustitución de tejido dañado. El beneficio para estas personas sería evitar ser operadas para la extracción de las matrices ya que éstas son biodegradables, por lo tanto el impacto directo se resumiría en menor dolor y menores riesgos en el tratamiento.

Se incluyen también en este apartado, lo que se consideran como buenas prácticas por parte de la institución: el tratamiento de los vertidos, aguas residuales, residuos, etc. La empresa gestora de los residuos químicos generados por los laboratorios de la ETSEIB es ECOCAT, junto con la colaboración del Centre per a la Sostenibilitat Territorial (CST).

Los envases para almacenar los residuos especiales son todos de polietileno de alta densidad (HDPE), siendo herméticos los utilizados para residuos biopeligrosos. Algunos de los envases que se han utilizado son los que se pueden ver en la Figura 8.1.



**Figura 8.1.** Envases residuos especiales. a) envase para líquidos; b) envase para sólidos; c) envase para residuos biopeligrosos.

## 8.2. Equipos y material diverso

Debido a la utilización de los equipos para la realización de este PFC se derivan una serie de impactos ambientales indirectos. Estos están asociados a la elaboración, funcionamiento y transporte de instrumentación, material de laboratorio y productos químicos.

También, se ha utilizado material de oficina (mobiliario, impresoras, ordenadores, papel, fotocopidora...), cuyo impacto ambiental es análogo al del material de laboratorio y los equipos.

Cabe remarcar que plástico y papel fueron depositados en contenedores adecuados para su posterior reciclado.

## 8.3. Servicios generales

Por último se deben mencionar los impactos ambientales negativos derivados del uso de servicios generales. Principalmente destacan los siguientes:

- Electricidad: genera un impacto muy grande causado por la explotación de recursos no renovables, emisión de contaminantes y construcción de instalaciones con el consiguiente consumo de materiales, energía y en parte destrucción del medio.
- Agua: es un recurso de vital importancia para los seres vivos que tras su utilización genera contaminación. Una vía de recuperación es la posibilidad de instalar una planta para su depuración, sin embargo este hecho conlleva una serie de impactos asociados (construcción y explotación de la planta, con consumo de materiales y energía, emisión de contaminantes asociados y destrucción del medio donde se implanta la instalación).
- Aire acondicionado y calefacción: se asocian al consumo eléctrico y a las emisiones generadas por pérdidas de refrigerantes e impactos originados por una caldera (consumo de recursos no renovables, emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera, liberación de partículas sólidas...).

## 9. Evaluación económica del PFC

La evaluación económica de un proyecto de investigación no resulta de un cálculo fácil, dado que no hay una recuperación económica efectiva del trabajo y los gastos implican diversas partidas. Para realizar este análisis se divide en las tres mayores partidas, coste de los productos químicos, coste del material (equipos) y coste del personal implicado.

### 9.1. Coste de los materiales (productos químicos)

Producto Químico	Coste (€/u)	Cantidad	Coste (€)
Acetona	47/L	0.5L	23,5
Cloroformo	70/L	1L	70,0
Etanol	41/L	2L	82,0
Ácido pimélico	22/100g	70g	15,4
Ácido azelaico	41/100g	70g	28,7
1,9 nonanodiol	38/250g	150g	22,8
Dicloruro del ácido azelaico	103/5g	2g	40,8
PCL	94,10/250g	10g	3,8
HFIP	300/L	0.25L	75,0
Éter	67,30/L	0.5L	33,6
Ácido glicólico	55/100g	10g	5,5
Ácido aminohexanóico	105/500g	50g	10,5
HCl	144.5/2.5L	0.1L	5.8
NaOH	90/1Kg	50g	4,5
<b>Total</b>			<b>421,9</b>

## 9.2. Coste del material (equipos)

En este apartado se incluyen los costes de la utilización de los equipos a lo largo de la realización del PFC. El coste incurrido en cada instrumentación utilizada se calcula a partir del precio de compra del equipo, su periodo de amortización y el tiempo durante el que se ha estado utilizando (aproximadamente 10 meses de investigación). Asimismo, y dado que otras personas han estado haciendo uso del material mientras se realizaban los ensayos de este PFC, el coste se repartirá entre todos los usuarios. El cálculo pormenorizado se recoge en la siguiente Tabla:

Instrumento	Precio (€)	Tasa amortización (años)	de N° personas	Coste (€)
Calorímetro	62000	10	12	434,0
Balanzas	1500	5	15	16,7
Phmetro	480	5	15	5,3
Microscopio óptico	12000	15	7	96,0
Cámara digital MO	7800	5	7	187,0
Microscopio electrónico (TEM+SEM)	210000	15	10	1176,0
Máquina de electrospinning	20000	4	5	875,0
Espectrofotómetro IR	24000	10	7	288,0
Espectrofotómetro RMN	240000	15	12	1120,0
Espectrofotómetro UV	12000	10	10	101,0
Biocompatibilidad (incubadura CO <sub>2</sub> , cabina flujo laminar, etc...)	30000	10	6	464,0
TOTAL				4.763,0

### 9.3. Coste de personal

El gasto de personal se ha estimado de acuerdo a las horas dedicadas a la elaboración y ejecución del proyecto:

Fase	Duración (h)	Precio (€/h)	Coste (€)
Estudio previo y Documentación	64	15	960,0
Experimentación	720	15	10.800,0
Análisis de resultados	160	15	2.400,0
<b>Coste total de personal</b>			<b>14.160,0</b>

### 9.4. Costo Total del Proyecto

El costo total se obtiene a partir de la suma de los costos de los diferentes conceptos expuestos anteriormente, y se adiciona las partidas por concepto de gastos generales y el overhead de la UPC. Los gastos generales está asociado a los gastos propios del proyecto, y el overhead de la UPC cubre los gastos indirectos asociados a la ejecución del proyecto en las instalaciones de la UPC.

Concepto	Costo (€)
Personal	14.160,0
Materiales	421,9
Equipamiento	4.763,0
<b>Subtotal</b>	<b>19.344,9</b>
Gastos Generales (10%)	1.934,5
Overhead UPC (16,7%)	3.230,6
<b>TOTAL</b>	<b>21.603,0</b>

## Agradecimientos

Agradezco la Dirección de este PFC a los Profesores Jordi Puiggalí y Luis J. del Valle. Asimismo a todos los miembros del Grupo de Investigación en Polímeros Sintéticos. Estructura y Propiedades (PSEP) del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Politècnica de Catalunya.

A los compañeros del laboratorio que han colaborado en la realización de mi PFC.

Finalmente, a mi familia que constantemente me ha apoyado a lo largo mi carrera.

## Bibliografía

- [1] PUIGGALÍ BELLALTA, J. *Apuntes de "Estructura y propiedad de los polímeros", "Física de polímeros"*. Barcelona, ETSEIB – CPDA, 2008.
- [2] MUÑOZ GUERRA, S. *Estructura y caracterización de polímeros*. Barcelona, ETSEIB - CPDA, 2002.
- [3] FLORY, P. J. *Polymer Chemistry* New York: Cornell University Press, 1995.
- [4] DE LA CIERVA, J. *Materiales Plásticos: Estructura y Propiedades de los polímeros; Materiales Plásticos, Elastómeros, Instituto de Plástico y Caucho*. Revista de Plásticos Modernos, Anuario Plásticos, Madrid, Edición Extraordinaria, 1976, p. 3-291.
- [5] ARMELIN, E. Síntesis y caracterización de nuevas poliesteramidas: estudio de sus propiedades. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España, 2002.
- [6] KOHN, J., LANGER, R. Bioresorbable and bioerodible materials. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego, CA: Academic Press; 1996. p 64-73.
- [7] MIDDLETON, J.C., TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, 2000, 21(23):2335-46.
- [8] HAYASHI, T. Biodegradable polymers for biomedical applications. *Prog Polymer Sci.*, 1994, 19: 663-702.
- [9] BJÖRK, E., EDMAN, P. Degradable starch microspheres as a nasal delivery system for insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 1988, 47(1-3):233-238
- [10] MAJETI, N.V., RAVI KUMAR, M.N.V. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2000, [online computer file], 3,234.
- [11] PACHENCE, J.M., KOHN, J. Biodegradable polymers. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J, editors. *Principles of Tissue Engineering* (2nd Edition). San Diego, CA: Academic Press; 2000. p 263-277.
- [12] CHAPEKAR, M. Tissue engineering: challenges and opportunities. *J Biomed Mater Res Appl Biomater.*, 2000, 53: 617-620.
- [13] LANGER, R., VACANTI, J. P. Tissue engineering, *Science*, 1993, 260:920-926.
- [14] MIKOS, A., TEMENOFF, J. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electronic Journal of Biotechnology*, North America, 2000, 8:315.
- [15] MAQUET, V., JEROME, R. Design of Macroporous Biodegradable Polymer Scaffolds for Cell Transplantation. *Mater. Sci. Forum*, 1997, 250:15-42.
- [16] THOMSON, R.C., WAKE, M.C., YASZEMSKI, M., MIKOS, A.G. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. *Adv. Polym. Sci.*, 1995, 122:247-274.
- [17] HARDIN YOUNG, J., TEUMER, J., ROSS, R.N., PARENTEAU, N.L. Approaches to transplanting engineered cells and tissues. In: Lanza, R., Langer, R. and Vacanti, J.,



- Editors. Principles of Tissue Engineering, 2nd Edition, Academic Press, 2000, pp. 281-291.
- [18] LANGER, R. Selected advances in drug delivery and tissue engineering. *J. Control. Rel.* 1999, 62:7-11.
- [19] L'HEUREUX, N., PAQUET, S., LABBE, R., GERMAIN, L., AUGER, F.A. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J.* 1998, 12:47-56
- [20] KIM, B.S., MOONEY, D.J. Engineering smooth muscle tissue with a pre-defined structure. *J Biomed Mater Res.*, 1998, 41:322–332.
- [21] GOMES, M.E., REIS, R.L. Biodegradable Polymers and Composites in Biomedical ... Regeneration. *International Materials Reviews*, 2004, 49:274-285
- [22] DVIR, T.T., BIRAN, P., KOHANE, D.S., LANGER, R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology.* 2011, 6:13-22.
- [23] BOGNITZKI, M., CZADO, W., FRESE, T., SCHAPER, A., HELLWIG, M., STEINHART, M. Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Advanced. Materials*, 2001, 13:70-72.
- [24] BHARDWAJ, N., KUNDU, C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances.* 2010, 28:325-347.
- [25] FORMHALS, A. US Patent. 1934, 1,975,504.
- [26] SILL, T.J., VON RECUM, H.A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 2008, 29:1989-2006.
- [27] HUANG, Z.M., ZHANG, Y.Z, KOTAKI, M., RAMAKRISHNA, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology.* 2003, 63:2223-2253.
- [28] SHIN, Y.M., HOHMAN, M.M., BRENNER, M.P., RUTLEDGE, G.C. Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer.* 2001, 42:9955-9967.
- [29] WANG, Z.G., WAN, L.S., LIU, Z. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2009, 56(4): 189-195.
- [30] BURGER, C., HSIAO, B.S., CHU, B. Nanofibrous materials and their applications. *Annual Review Materials Research.* 2006, 36:333-368.
- [31] MARTÍNEZ, P., MARÍN, P. Diseño y estudio de una máquina de Electrospinning. Proyecto final de carrera, Ingeniería Técnica Química, EUETIB, UPC, Julio 2009
- [32] KOHN, J., LANGER, R. *Biomaterials Science*, (ed. B. Ratner et al), New York, Academic Press, 64, 1996.
- [33] LI, D., XIA, Y. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the Wheel?. *Advanced Materials.* 2004, 16 (14):1151-1170.
- [34] HOHMAN, M. et al. Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. *Physics of Fluids.* 2001, 13:2201-2220.

- [35] FRENOT, A., CHRONAKIS, I.S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2003, 8:64-65.
- [36] HAYASHI, T. *Program Polymer Science*. 1994, Vol. 19, p. 663
- [37] BUCHKO, C.J., CHEN, L.C., SHEN, Y., MARTIN, D.C. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*. 1999, 40 (26):7397-7407.
- [38] BUCHKO, C.J., et al. Mechanical properties of biocompatible protein polymer thin films. *Journal of Materials Research*. 2000, 15(1):231-242.
- [39] BUCHKO, C.J., KOZLOFF, K.M., MARTIN, D.C. Surface characterization of porous, biocompatible protein thin films. *Biomaterials*. 2001, 22(11):1289-1300.
- [40] LAURENCIN, C.T., et al. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annual Review Biomedical Applications*. 1999, 1:19-46.
- [41] LIAO, T., ADANUR, S. Computerized failure analysis of nonwoven fabrics based on fiber failure criterion. *Textile Research Journal*. 1999, 69(7):489-496.
- [42] AGRAWAL, C.M., RAY, R.B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001, 55(2):141-150.
- [43] BUSCHLE-DILLER, G., COOPER, J., XIE, Z., WU, Y., WALDRUP, J., REN, X. Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers. *Cellulose*. 2007, 14(6): 553-562.
- [44] JIN, R., SHAH, N.H., MALICK, A.W., RHODES, C.T. Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poly(Ester) Devices: Different Preparative Approaches. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1998, 24(8):703-727.
- [45] IMAZ, I., HERNANDO, J., RUIZ-MOLINA, D., MASPOCH, D. Metal-Organic Spheres as Functional Systems for Guest Encapsulation. *Angewandte Chemical International Edition*. 2009, 48(13):2325-2329.
- [46] USERO, R., SUÁREZ, N. Electrospinning de poliésteramidas biodegradables. Proyecto final de carrera, Ingeniería Técnica Química, EUETIB, UPC, Julio 2009, p. 21-22
- [47] COLLET GONZÁLEZ, A. Nuevas poliésteramidas biodegradables derivadas de ácido glicólico y aminoácidos con aplicación en biomedicina. Tesis Master. Universitat Politècnica de Catalunya, Departament d'Enginyeria Química. Barcelona, España, 2004.
- [48] ROYO RAMOS, M. Matrices de copoliésteres derivados de los ácidos azelaico y pimélico. Universitat Politècnica de Catalunya. Departament d'Enginyeria Química, Barcelona, España, 2011.
- [49] DEL VALLE, L.J., DIAZ, A., ROYO, M., RODRIGUEZ-GALAN, A., PUIGGALI, J. Biodegradable polyesters reinforced with triclosan loaded polylactide micro/nanofibers: Properties, release and biocompatibility. *eXPRESS Polym Lett.*, 2012, 6(4):266-282.
- [50] DEL VALLE, L., CAMPS, R., DÍAZ, A., FRANCO, L., RODRÍGUEZ-GALÁN, A., PUIGGALÍ, J. Electrospinning of polylactide and polycaprolactone mixtures for preparation of materials with tunable drug release properties. *Journal of Polymer Research.*, 2011, 18:1903-1917.